

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**



**VALOR PRONÓSTICO DEL ESTUDIO MOLECULAR EN  
TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES Y SU  
RELACIÓN CON LA RESISTENCIA AL CISPLATINO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Adelaida García Velasco**

Bajo la dirección del doctor  
Rafael Enríquez de Salamanca  
Hernán Cortés-Funes

**Madrid, 2009**

• **ISBN: 978-84-692-2763-3**

**© Adelaida García Velasco, 2008**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**VALOR PRONÓSTICO DEL ESTUDIO  
MOLECULAR EN TUMORES DE CÉLULAS  
GERMINALES Y SU RELACIÓN CON LA  
RESISTENCIA AL CISPLATINO**

**TESIS DOCTORAL**

**Adelaida García Velasco**

**2008**

### INFORME DEL DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Los abajo firmantes, directores de la Tesis Doctoral, titulada "Valor pronóstico del estudio molecular en tumores de células germinales y su relación con la resistencia al cisplatino" y presentada por Dña. Adalaida García Velasco, informamos que hemos dirigido personalmente los trabajos reflejados en la misma. Consideramos que esta Tesis reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentada y defendida.

Y para que así conste, lo avalamos.

Fdo.:

(Fecha y firma)

23 Junio 2008

D.N.I.: 7212993 D

Fdo.:

R. Enríquez de Salazar

(Fecha y firma)

23 Junio 2008

D.N.I.: 1.464.335 V

Fdo.:

H. Cortés - Jones

(Fecha y firma)

23 Junio 2008

D.N.I.: 33501116 Y.

A mi familia, por todo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Paz-Ares director de esta tesis. Por sus consejos, paciencia, dedicación y ayuda a lo largo de tantos meses de trabajo.

Al Profesor Dr. Rafael Enríquez de Salamanca, codirector de esta tesis, por su revisión crítica y colaboración en la recta final de este trabajo.

Al Dr. Hernán Cortés-Funes, codirector de esta tesis, por su impulso investigador, gracias al cual se puso en marcha éste y otros muchos estudios.

Al Dr. Ignacio Durán, compañero infatigable en la investigación clínica, por su inestimable ayuda en la recopilación de muestras y recogida de datos.

A los Drs. Claudio Ballestín, Francisco Martínez-Tello, Elena García y Ana Saiz, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, por su minucioso trabajo en la revisión de las biopsias y el esfuerzo realizado para completar el estudio inmunohistoquímico.

A la Dra. Melina Vega de Céniga por su revisión crítica y objetiva de este trabajo, su apoyo incondicional y su amistad.

A todos los miembros del Servicio de Oncología Médica y del Servicio de Archivos y Documentación del Hospital Universitario 12 de Octubre, por su paciencia y colaboración.

A los oncólogos y patólogos de otros hospitales de España que de forma desinteresada nos han cedido el material histológico de pacientes tratados inicialmente en sus centros.

Al Dr. Joan Brunet, jefe de Servicio de Oncología Médica del Institut Català d'Oncologia en Girona, por su trabajo en el fomento de la investigación oncológica. Sin su apoyo la finalización de este trabajo no hubiera sido posible.

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1.1 EPIDEMIOLOGÍA	15
1.2 CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA	18
1.3 BIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL	22
1.4 DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE EXTENSIÓN	24
1.5 CLASIFICACIONES CLÍNICAS Y PRONÓSTICAS	28
1.6 TRATAMIENTO	34
1.7 QUIMIOSENSIBILIDAD DE LOS TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES Y POSIBLES MECANISMOS DE QUIMIO- RESISTENCIA.	45
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
2.1 HIPÓTESIS	59
2.2 OBJETIVOS	60
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>61</b>
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	62
3.2 RECOGIDA DE DATOS	63
3.3 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	68
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71

3.5	ASPECTOS ÉTICOS	73
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>74</b>
4.1	CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	75
4.2	EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES	85
2.3	Ciclina D1	90
4.3	FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO	97
4.3.1	Valor de los factores pronósticos clásicos como predictivos de la respuesta al tratamiento	97
4.3.2	Valor de los marcadores moleculares estudiados como predictivos de la respuesta al tratamiento	100
4.4	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	102
4.4.1	Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global	102
4.4.2	Impacto de los factores pronósticos clásicos en la SLE y la SG	102
4.4.3	Impacto de los marcadores moleculares en la SLE y la SG	112
4.4.4	Análisis univariante	117
4.4.5	Análisis multivariante	119
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>120</b>
5.1	MARCADORES MOLECULARES	123
5.1.1	p53	123
5.1.2	Mdm2	127
5.1.3	Ciclina D1	132

5.1.4	Ciclina D2 -----	134
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES-----</b>	<b>139</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS -----</b>	<b>142</b>
7.1	ANEXO I. CENTROS COLABORADORES-----	143
7.2	ANEXO II. ABREVIATURAS -----	144



## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Imagen correspondiente a un seminoma clásico.	
Tinción H/E -----	18
Fig. 2. Imagen correspondiente a un carcinoma embrionario.	
Tinción H/E -----	20
Fig 3a. Ciclo celular y vías de regulación de apoptosis-----	48
Fig 3b. Vías de regulación de apoptosis -----	48
Fig 4. Ciclo celular y proteínas moduladoras. Ciclinas D -----	53
Fig. 6. Imagen correspondiente a un coriocarcinoma con tinción positiva intensa para p53 -----	85
Fig. 5. Expresión tisular de p53 -----	86
Fig. 7. Expresión tisular de MDM2 -----	88
Fig. 8. Imagen correspondiente al corte de un teratocarcinoma con tinción positiva intensa para mdm2 -----	90
Fig. 9. Expresión tisular de CD1 -----	91
Fig. 10. Imagen correspondiente al corte de un teratocarcinoma con tinción positiva leve para CD1 -----	91
Fig. 11. Expresión tisular de CD2 -----	93
Fig. 12. Imagen correspondiente al corte de un coriocarcinoma con tinción positiva intensa para CD2---	95

Fig. 13a. SLE en seminomas y no seminomas -----	103
Fig. 13b. SG en seminomas y no seminomas -----	103
Fig. 14a. SLE según la presencia ó no de carcinoma embrionario -----	104
Fig. 14b. SG según la presencia ó no de carcinoma embrionario -----	104
Fig. 15a. SLE según la presencia ó no de tumor del seno endodérmico -----	105
Fig. 15b. SG según la presencia ó no de tumor del seno endodérmico -----	105
Fig. 16a. SLE en función del valor de AFP sérica-----	106
Fig. 16b. SG en función del valor de AFP sérica -----	106
Fig. 17a. SLE en función del valor de BHCG sérica-----	107
Fig. 17b. SG en función del valor de BHCG sérica -----	107
Fig. 18a. SLE en función del valor de LDH sérica -----	108
Fig. 18b. SG en función del valor de LDH sérica -----	108
Fig. 19a. SLE según estadio M-----	109
Fig. 19b. SG según estadio M -----	109
Fig. 20a. SLE según la localización del tumor primario-----	110
Fig. 20b. SG según la localización del tumor primario -----	110
Fig. 21a. SLE según el grupo de riesgo IGCCCG-----	111

Fig. 21b. SG según el grupo de riesgo IGCCCG -----	111
Fig. 22a. SLE según la expresión de p53 -----	112
Fig. 22b. SG según la expresión de p53 -----	113
Fig. 23a. SLE según la expresión de mdm2 -----	113
Fig. 23b. SG según la expresión de mdm2 -----	114
Fig. 24a. SLE según la expresión de Ciclina D1-----	114
Fig. 24b. SG según la expresión de Ciclina D1 -----	115
Fig. 25a. SLE según la expresión de Ciclina D2-----	115
Fig. 25b. SG según la expresión de Ciclina D2 -----	116

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del “Royal Marsden Hospital” -----	29
Tabla 2. Clasificación de la AJCC-TNM -----	30
Tabla 3. Estadíos tumorales según la AJCC-TNM -----	31
Tabla 4. Internacional Germ Cell Cancer Collaborative Group Classification (IGCCCGC): clasificación de riesgo de los TCG avanzados. -----	33
Tabla 5. Anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico -----	69
Tabla 6(a). Características clínicas de los pacientes -----	77
Tabla 6(b). Características de los pacientes: Tratamientos. -----	79
Tabla 6(c). Características de los pacientes refractarios a quimioterapia basada en cisplatino. -----	82
Tabla 6(d). Características de los pacientes: fin de seguimiento-----	83
Tabla 7. Características de las muestras histológicas-----	84
Tabla 8a. Expresión tisular de p53 (%)-----	86
Tabla 8b. Expresión de P53. -----	87
Tabla 9a. Expresión tisular de mdm2 (%) -----	88
Tabla 9b. Expresión de Mdm2.-----	89
Tabla 10a. Expresión tisular de Ciclina D1 (%)-----	90

Tabla 10b. Expresión de Cyclina D1 -----	92
Tabla 11a. Expresión tisular de Cyclina D2 (%)-----	93
Tabla 11b. Expresión de Cyclina D2-----	94
Tabla 13. Análisis univariante para SLE -----	117
Tabla 14. Análisis univariante para SG -----	118
Tabla 15a. Predictores de SLE en el análisis multivariante ----	119
Tabla 15b. Predictores de SG en el análisis multivariante-----	119
Tabla 16. Expresión tisular de p53 y TCGs testiculares.	
Trabajos seleccionados -----	126
Tabla 17. Mdm2 y TCGs testiculares. Estudios publicados ----	131
Tabla 18. Cyclina D2 y TCGs testiculares. Estudios	
publicados -----	136
Tabla 19. Expresión tisular de cyclina D2 y estadio tumoral	
según la AJCC -----	138

# **1. INTRODUCCIÓN**

El tumor de células germinales (TCG) en el varón es una neoplasia poco frecuente pero tiene una gran relevancia en el campo de la oncología: en los últimos treinta años se ha convertido en el modelo de neoplasia sólida curable, con una tasa de curaciones cercana al 99% en estadíos iniciales y al 80% en estadíos avanzados.

El factor fundamental que determina la alta tasa de curaciones de este tipo de tumores es su extraordinaria sensibilidad a una gran variedad de agentes quimioterápicos, y en particular al cisplatino. Aun así, a pesar de los grandes logros obtenidos en el tratamiento de los TCG el 20-30% de los pacientes fallecen por esta enfermedad.

El estudio de los TCG, la aproximación a su comportamiento, pronóstico, y los avances en su tratamiento, plantea dos grandes interrogantes: (1) **¿Cuáles son las circunstancias que acontecen en los TCG para obtener cifras globales de curación superiores al 90%?** Y (2) **¿Por qué entre un 40 y un 50% de los pacientes con tumores de mal pronóstico acaban falleciendo de una enfermedad curable en la mayoría de los casos?**

El hecho de que los tumores de células germinales sean modelo de quimiosensibilidad hace aún más sorprendente la escasez de estudios sobre poblaciones tumorales resistentes al tratamiento inicial ó recidivantes tras el mismo. El objetivo fundamental de este estudio es la identificación de marcadores biológicos y moleculares de quimio-resistencia en estas neoplasias.

### 1.1 EPIDEMIOLOGÍA

Los tumores de células germinales (TCG) representan entre el 1% y el 1.5% de todas las neoplasias en el varón<sup>1</sup> y son los tumores sólidos más frecuentes en varones jóvenes (15-34 años). Su incidencia en esta franja de edad llega hasta un 30%, lo cual conlleva un impacto social de extraordinaria importancia.

Estos tumores, por razones aún no conocidas, han presentado un incremento lento pero progresivo en los países industrializados, pasando de 3.7 nuevos casos por 100.000 habitantes diagnosticados en Estados Unidos en 1975 a 5.7 nuevos casos por 100.000 habitantes en el año 2000<sup>2</sup>.

La incidencia de los TCG varía según la localización geográfica con un claro gradiente Norte - Sur y Oeste - Este, siendo máxima en Dinamarca y Nueva Zelanda, y mínima en el Extremo Oriente<sup>3</sup>. España, según los registros de población de Tarragona, Gerona y Navarra, se encuentra dentro de los países de frecuencia intermedia<sup>1</sup>.

La raza es también un factor diferencial en la incidencia de los TCG hasta el punto de que entre los negros-americanos la tasa de nuevos casos por 100.000 habitantes entre 1996 y 2000 es de 1.4, a diferencia de la de 6.1 por 100.000 habitantes en blancos en el mismo periodo<sup>2</sup>.

Los tumores de células germinales son más frecuentes entre los 15 y los 35 años, con un segundo pico de incidencia en torno a los 65 años. En el 90% de los casos se localizan en el testículo, pero un 10% presentan una localización primaria extra-gonadal en algún punto de la línea media del cuerpo (retroperitoneo, mediastino ó glándula pineal).

Aproximadamente el 40% de los TCG se diagnostican en estadio I, localizado en el testículo, y un 60% presentan estadios avanzados al diagnóstico. A pesar de una buena respuesta al tratamiento quimioterápico inicial, entre un 20% y un 30% de los



pacientes con enfermedad diseminada no lograrán una remisión completa o presentarán una recidiva<sup>4</sup>.

El comportamiento de estas neoplasias es único en el campo de la oncología: cuando se emplean correctamente los medios que tenemos a nuestro alcance las tasas de curaciones superan el 90%, y esto ha permitido que actualmente la tasa de supervivencia global a los cinco años en Europa sea del 93%<sup>1</sup>.

### **1.1.1 Factores de Riesgo**

Aunque se han identificado distintos factores relacionados con un mayor riesgo de aparición de tumores de células germinales, la mayoría de los pacientes no presentan ningún factor de riesgo conocido.

#### **1.1.1.1 Tumor testicular previo**

Entre un 1% y un 3% de los pacientes con tumores testiculares desarrollarán una segunda neoplasia primaria contralateral, lo cual representa un riesgo 500 veces mayor que la población masculina normal<sup>5</sup>.

#### **1.1.1.2 Criptorquidia**

Los pacientes con antecedentes de criptorquidia tienen un riesgo entre 20 y 30 veces mayor al de la población normal de presentar un tumor testicular, y curiosamente en el 10% de los casos éste aparece en el testículo contralateral al criptorquídic. Además, los testículos abdominales no descendidos tienen un alto riesgo de desarrollar una neoplasia de células germinales<sup>6</sup>. La orquidopexia realizada antes de la pubertad reduce el riesgo y favorece un mejor seguimiento.

#### **1.1.1.3 Cromosomopatías**

Alteraciones genéticas como el Síndrome de Down y el Síndrome de Klinefelter se han relacionado con un aumento del riesgo de TCGs testiculares y TCGs mediastínicos respectivamente<sup>7</sup>.

### **1.1.1.4 Predisposición familiar**

Se ha observado cierta agregación familiar en la aparición de estas neoplasias, con una mayor incidencia en gemelos univitelinos<sup>8</sup>.

### **1.1.1.5 Exposición a tóxicos y traumatismo testicular**

La exposición a determinados tóxicos como el fármaco dietilestilbestrol<sup>9</sup> y el antecedente de un traumatismo testicular, aunque se han relacionado con un aumento en la incidencia de TCGs, no han demostrado su asociación en estudios epidemiológicos. En todo caso parece que un traumatismo testicular puede acelerar el diagnóstico ya que conlleva una exploración del testículo y esta, a su vez, el hallazgo de la tumoración.

### **1.1.1.6 Virus**

Otros factores de riesgo como las infecciones virales testiculares se han estudiado en relación a un aumento de incidencia de TCG sin resultados concluyentes. Recientemente la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana se ha relacionado con un aumento de la incidencia de seminomas testiculares<sup>10</sup>.

## 1.2 CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA

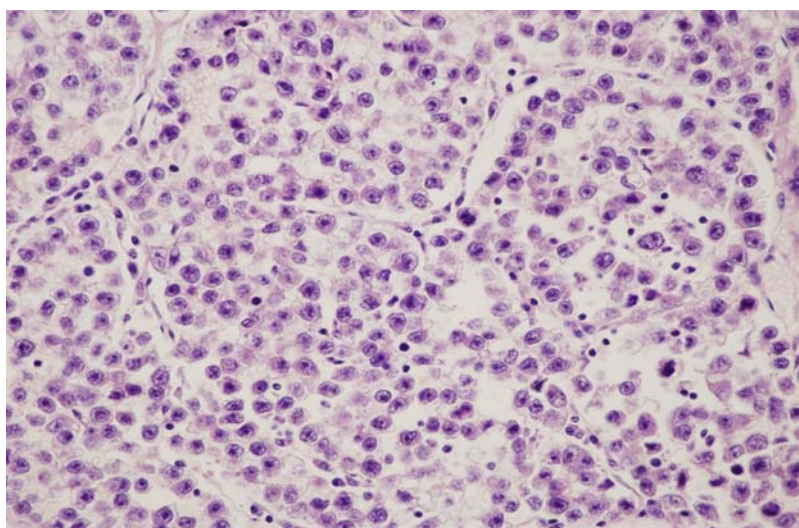
Los tumores de células germinales se clasifican en dos grandes categorías histológicas con implicaciones clínicas y terapéuticas distintas: Seminomas y No Seminomas. La histogénesis de estas neoplasias es muy compleja y origina que solo un 40% de los seminomas y un 20% de los no-seminomas sean variantes puras.

### 1.2.1 Seminomas

Suponen un 47% de los tumores de células germinales, y en testículos criptorquídicos hasta un 60%<sup>11</sup>. Se diagnostican con mayor frecuencia entre los 35 y los 45 años.

El seminoma típico, ó clásico, se caracteriza por hileras de células grandes con citoplasma abundante y núcleo redondo con nucleolo prominente. Es frecuente que se asocie un infiltrado leucocitario y/o una reacción granulomatosa. Hasta un 15% de los seminomas clásicos tienen focos de células de sincitiotrofoblasto productoras de gonadotropina coriónica (b-HCG), que no influyen en el pronóstico ni en el tratamiento de los mismos<sup>12</sup>.

**Fig. 1. Imagen correspondiente a un seminoma clásico. Tinción H/E [paciente nº 16]**



El seminoma atípico tiene un patrón histológico diferente: No se observa infiltrado linfocitario ni reacción granulomatosa, hay más componente de necrosis y la relación núcleo/citoplasma es mayor. Con frecuencia la tinción inmunohistoquímica para queratina de bajo peso molecular es positiva, a diferencia del seminoma típico en el que siempre es negativa. En cualquier caso no se ha encontrado ninguna asociación sólida entre esta variedad histológica y un peor pronóstico.

El seminoma espermatocítico es una variante histológica poco frecuente con características inmunohistoquímicas diferentes, que suele presentarse en varones mayores de 45 años. Su potencial metastático es mínimo<sup>13</sup>.

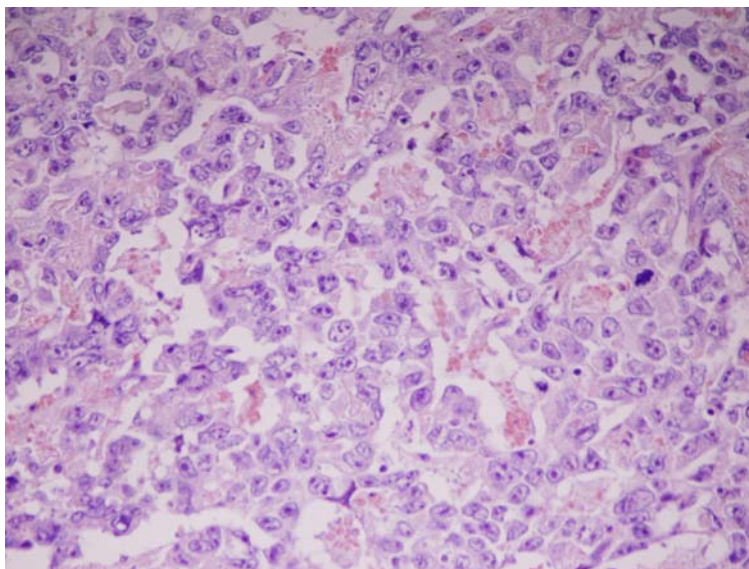
### **1.2.2 Tumores de células germinales no seminomatosos (TGNS)**

A diferencia de los seminomas su incidencia se sitúa en una edad más temprana que los seminomas (15-30 años), siendo máxima en la tercera década de la vida.

Los TGNS comprenden cuatro tipos histológicos: Carcinoma embrionario, teratoma, coriocarcinoma y tumor del seno endodérmico (también llamado tumor del saco vitelino). La mayoría de estos tumores son mixtos, constituidos por dos ó más de tipos celulares. Con frecuencia se pueden encontrar en ellos focos de seminoma, pero el seminoma puro se define por la ausencia de otros componentes en su histología, ya que la presencia de cualquier tipo celular no seminomatoso (excepto células de sincitiotrofoblasto) confiere al tumor un pronóstico propio de los no-seminomas, y por tanto deberá ser tratado como tal<sup>14</sup>.

El carcinoma embrionario es el tipo celular más indiferenciado, con capacidad totipotencial para diferenciarse a cualquier otra estirpe no seminomatosa. Puede producir niveles séricos elevados de B-HCG, alfa-fetoproteína, ó ambos.

**Fig. 2. Imagen correspondiente a un carcinoma embrionario. Tinción H/E [paciente n° 23]**



El coriocarcinoma está compuesto por citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos. En raras ocasiones es puro, y se asocia con una tendencia a la diseminación metastásica vía hematógica y niveles séricos muy elevados de B-HCG. En el manejo de este tipo de tumores es importante conocer su intensa neo-angiogénesis tanto en su localización primaria como en las metástasis; este hecho conlleva una elevada tendencia al sangrado intratumoral y puede dar lugar a complicaciones graves que se pueden precipitar con el inicio del tratamiento quimioterápico<sup>15</sup>.

El tumor del seno endodérmico, llamado también tumor del saco vitelino, se caracteriza microscópicamente por el hallazgo de los llamados cuerpos de Shiller-Duval. Es la histología más frecuente en la infancia. Con frecuencia se encuentra en los tumores de localización mediastínica y su comportamiento es más agresivo. El 93% de estos tumores produce alfafetoproteína.

Los teratomas están compuestos por tejidos derivados de dos ó tres de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), y pueden encontrarse en diferentes estados de maduración. Según el grado de diferenciación de los elementos que lo componen se distinguen tres tipos de teratoma: maduro,

inmaduro, y con transformación maligna. Tanto el teratoma maduro como el inmaduro, en el que predominan los tejidos fetales y embrionarios, son de características benignas. Un fenómeno característico del teratoma (maduro ó inmaduro) es su capacidad de transformación maligna, y es por ello que se recomienda la resección total cuando aparece en lesiones residuales. El teratoma maligno contiene células malignas similares a las de diversos tumores somáticos (ej. rabdomiosarcoma ó adenocarcinoma). En cualquier caso siempre que se trate de un teratoma puro los marcadores séricos serán normales.

## **1.3 BIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL**

### **1.3.1 Fase preclínica**

La historia natural biomolecular de los tumores de células germinales se inicia con la aparición de la lesión denominada “neoplasia intratubular testicular” (TIN)<sup>16</sup>. Las células TIN son parecidas a los gonocitos ó células germinales primordiales del testículo embrionario con alteraciones citogenéticas clonales comunes tanto a seminomas como a no-seminomas, lo cual sugiere un origen común de todos los TCG<sup>17</sup>. En pacientes con TIN la probabilidad acumulada para el desarrollo de un tumor testicular es del 70% a los 7 años<sup>18</sup>, pero el factor fundamental que favorece la transformación maligna aún no está definido. Las diversas hipótesis a este respecto sitúan la expresión de la ciclina D2 en células TIN y la sobre-expresión de p53 no mutado (“wild-type”) como elementos clave en el desarrollo de los TCG<sup>19</sup>.

Este tipo de lesiones se pueden detectar en un pequeño porcentaje de varones sometidos a tratamiento de fertilidad, y hasta en un 5% de pacientes con historia de tumor testicular contralateral<sup>20</sup>.

### **1.3.2 Fase clínica**

El TCG crece localmente invadiendo las diferentes estructuras testiculares (túnica albugínea, rete testis, epididmo, cordón espermático y escroto). En la mayoría de los casos el primer signo será una masa testicular indolora, aunque hasta en un 60% de los casos puede acompañarse de dolor, lo que dificulta el diagnóstico diferencial con procesos inflamatorios, fundamentalmente con la epididimitis<sup>4</sup>. No es infrecuente la ginecomastia bilateral por producción tumoral de B-HCG, y tampoco que en el momento del diagnóstico aparezcan síntomas secundarios a la diseminación a distancia, incluso como única manifestación de la enfermedad, como es el caso del dolor lumbar causado por metástasis

retroperitoneales. En casos más avanzados puede existir disnea y hemoptisis por metástasis pulmonares, siendo esto más característico del coriocarcinoma.

El patrón de diseminación del cáncer testicular es relativamente predecible: se inicia vía linfática hacia los ganglios retroperitoneales (el drenaje del lado derecho hacia ganglios paracavos y/o interaortocavos, y el izquierdo a ganglios paraaorticos a nivel del hilio renal), y continúa más tarde vía hematógena hacia el pulmón u otras localizaciones viscerales. El drenaje linfático escrotal difiere del testicular (se dirige a ganglios inguinales ó pélvicos) por lo que una cirugía incorrecta (vía escrotal en lugar de inguinal) puede modificar el patrón de diseminación<sup>21</sup>.

Las metástasis a distancia vía hematógena (fundamentalmente pulmonares, cerebrales y hepáticas) suelen ser tardías en el seminoma y más precoces en los TGNS (sobre todo las variantes histológicas de carcinoma embrionario y coriocarcinoma). Solo un 10% de los pacientes presentan al diagnóstico metástasis a distancia sin evidencia de adenopatías retroperitoneales.

En una minoría de pacientes la manifestación inicial del tumor primario tiene lugar a nivel extragonadal (retroperitoneo ó mediastino). Un tercio de estos presentarán lesiones compatibles con neoplasia intratubular a nivel testicular; En otro tercio una ecografía del testículo mostrará una zona de tejido cicatricial compatible con un “tumor testicular quemado” (Burned-out); y tan solo la tercera parte de los pacientes presentará realmente un tumor germinal extragonadal primario<sup>22</sup>.



## **1.4 DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE EXTENSIÓN**

### **1.4.1 Diagnóstico del tumor primario**

La clave del diagnóstico de los tumores germinales reside en que el facultativo piense en la posibilidad de su presencia. Ante la aparición de una masa testicular indolora, dolor lumbar ó una masa retroperitoneal, mediastínica ó supraclavicular en un varón joven siempre se ha de considerar el diagnóstico de TCG<sup>23</sup>.

En más del 90% de los casos la palpación testicular en la exploración física, una ecografía testicular y la determinación sérica de marcadores (alfa-fetoproteína y gonadotropina coriónica) confirman el diagnóstico<sup>4</sup>. La concentración en suero de lactato deshidrogenasa (LDH) también es un importante factor pronóstico y debería ser determinado previo al inicio de cualquier tipo de tratamiento. Otros marcadores séricos (ej. isoenzimas de LDH) no se recomiendan como análisis diagnóstico de rutina<sup>24</sup>. Tampoco se recomiendan otras técnicas de diagnóstico por imagen (resonancia magnética ó tomografía por emisión de positrones) dado que sus resultados no van a modificar la actitud terapéutica.

En caso de negatividad de marcadores y masa testicular sospechosa el diagnóstico de tumor de células germinales debe ser confirmado histológicamente antes de cualquier tratamiento. La exploración intra-operatoria vía inguinal es la técnica indicada.

Histológicamente el tumor debe ser clasificado según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>25</sup>, y además debe especificar localización tumoral, tamaño, multiplicidad, extensión tumoral, presencia ó no de carcinoma in situ (CIS ó TIN), afectación de estructuras testiculares (rete testis, albugínea, y cordón), y la presencia ó ausencia de invasión vascular ó linfática. Una histología de carcinoma ó adenocarcinoma pobremente diferenciado es

altamente sugestiva de la presencia de tumor de células germinales y debe ser sometida a análisis inmunohistoquímico específico, y, si es posible, se debe determinar la expresión del isocromosoma i(12p) que es específico para esta entidad<sup>26</sup>.

En cualquier caso, en un paciente con enfermedad metastásica con riesgo vital y marcadores séricos (AFP; B-HCG) claramente elevados, se debe administrar tratamiento quimioterápico lo antes posible. En estos casos la orquiectomía se podrá posponer hasta que el paciente haya sido estabilizado clínicamente<sup>25</sup>.

### **1.4.2 Diagnóstico de la neoplasia intratubular testicular (TIN)**

En zonas de alto riesgo epidemiológico hasta un 5% de los pacientes con tumores testiculares presentan lesiones TIN en el testículo contra-lateral que pueden detectarse en el 99% de los casos con una biopsia abierta, por lo cual hay autores que recomiendan plantear al paciente la opción de una biopsia del testículo “sano” en el momento de la orquiectomía. En España el riesgo de TIN contra-lateral se sitúa por debajo del 1% y no se considera una práctica habitual.

En los casos de tumor primario extragonadal coexisten lesiones TIN unilaterales ó bilaterales hasta en un tercio de los pacientes con morfología testicular normal. El riesgo acumulado de desarrollar un tumor germinal testicular a los 10 años es del 10%. En cualquier caso, como el tratamiento del tumor germinal extragonadal incluye esquemas de quimioterapia basada en cisplatino que simultáneamente pudieran eliminar las lesiones TIN, no se recomienda la biopsia testicular.

### **1.4.3 Estudio de extensión**

El objetivo principal del estudio de extensión es un adecuado estadiaje que determine si nos encontramos ante un tumor inicial (que requiere un tratamiento

local) ó una enfermedad diseminada (que deberá ser tratada con tratamiento sistémico).

La tomografía computerizada (TC) es esencial en el diagnóstico de extensión de los TCG, tanto para conocer la enfermedad retroperitoneal como la pulmonar de pequeño tamaño. En general la TC es capaz de diagnosticar un 80% de los casos de enfermedad retroperitoneal, pero la tasa de falsos negativos puede llegar hasta un 30% debido a las dificultades de interpretación de la presencia de ganglios linfáticos patológicos basada únicamente en su morfología y tamaño<sup>27</sup>.

Otras técnicas de imagen como la ecografía ó la resonancia magnética (RM) abdomino-pélvica no aportan información adicional y se deben restringir a aquellos pacientes en los que la administración de contraste (oral ó intravenoso) no sea posible<sup>25</sup>.

En el momento actual es controvertido el valor del PET (tomografía de emisión de positrones) como técnica adecuada para el estadiaje de este tipo de tumores, y no está claro que su sensibilidad sea superior a la de la TC, por lo cual su uso no está generalizado fuera de estudios clínicos<sup>28</sup>.

Un escáner ó una RM craneal solo se recomienda en aquellos pacientes que presenten clínica sugestiva de metástasis intracraneales ó elevación de marcadores con criterios de alto riesgo (B-HCG > 50000 IU/l; AFP > 10000 ng/ml; LDH > 10 x límite superior normal).

### **1.4.4 Marcadores tumorales**

Hoy en día la determinación e interpretación de los marcadores tumorales AFP, B-HCG, y LDH en su contexto clínico se han convertido en la base del manejo clínico del cáncer testicular. Globalmente, un 80% de los TCG no-seminomatosos son productores de AFP, B-HCG, ó ambos. La LDH posee menor especificidad, pero se encuentra elevada hasta en un 70% de enfermos con seminoma y cerca de la mitad de TGNS<sup>29,30</sup>.

La AFP es una glicoproteína fetal que posee una vida media de 6 días. Su producción se asocia al tumor del seno endodérmico y al carcinoma embrionario, y nunca se encuentra elevada en el seminoma puro. La gonadotropina coriónica es una hormona producida normalmente por tejidos trofoblásticos (ej. placentarios) y también por el componente sincitiotrofoblástico de algunos tumores germinales, y tiene una vida media de 18-36 horas. Su subunidad alfa es similar a la de las hormonas hipofisarias y por ello se determina la cadena beta (B-HCG).

La utilidad de los marcadores tumorales no está limitada al diagnóstico en los tumores de células germinales, también juegan un papel muy importante en el pronóstico y seguimiento del paciente. Su evolución permite monitorizar la respuesta al tratamiento, la aparición de resistencias y la presencia de enfermedad residual viable. En los pacientes sin evidencia clínica de metástasis deben realizarse determinaciones seriadas de los marcadores sanguíneos tras la cirugía para confirmar un adecuado descenso de los mismos hasta su normalización, dado que en un 15% de estos pacientes la elevación persistente de los marcadores es el único signo de enfermedad residual subclínica<sup>31</sup>. Nunca deben tomarse decisiones terapéuticas en función de una única determinación de marcadores, sino en la dinámica de la curva de dos ó tres dosificaciones. Esto es especialmente importante en el caso de AFP y B-HCG cuya especificidad es muy alta, y la elevación en 3 determinaciones consecutivas de alguno de ellos en ausencia de enfermedad clínica ó radiológica debe considerarse generalmente indicativo de recidiva. La cifra total del marcador sérico tiene también valor pronóstico, pues es reflejo del volumen tumoral y la composición histológica del tumor.

Existen determinadas situaciones que pueden provocar una elevación de marcadores que no guarda relación con la progresión de la neoplasia. Es el caso del síndrome de lisis tumoral y la administración de factores estimulantes de colonias hematopoyéticas que elevan LDH, el hipogonadismo, que puede interferir en la determinación de B-HCG, y la elevación de AFP por daño hepático. El test de la concavalina-A entre otros es útil para discriminar esta última.

## **1.5 CLASIFICACIONES CLÍNICAS Y PRONÓSTICAS**

Existen diferentes sistemas de clasificación para el cáncer testicular que permiten definir el tratamiento inicial más adecuado para cada subgrupo de pacientes.

### **1.5.1 Clasificación clínica**

Los dos sistemas de clasificación por estadíos más extendidos en la práctica clínica son el sistema TNM y la clasificación propuesta por el Hospital Royal Marsden. Esta última, ampliamente utilizada en Europa, combina el tamaño ganglionar afecto en la zona retroperitoneal con la descripción en tamaño y número de las metástasis pulmonares y la presencia ó no de metástasis viscerales no pulmonares (Tabla 1).

El sistema TNM ha sido recientemente modificado por el American Joint Comite on Cancer (AJCC) y la Union Internationale Contre le Cancer (UICC), y adaptado a los criterios pronósticos más actuales (Tablas 2 y 3). En esta última revisión además de los criterios T (tumor)-N (node)-M (metastases) se incluyen los marcadores tumorales como factor pronóstico decisivo para orientar el tratamiento.

**Tabla 1.** Clasificación del “Royal Marsden Hospital”

<b><u>ESTADÍO I</u></b> <b>ESTADÍO Im</b>	Enfermedad confinada al testículo.  Estadío I radiológico con persistencia de marcadores elevados tras la cirugía.
<b><u>ESTADÍO II</u></b> <b>ESTADÍO IIA</b> <b>ESTADÍO IIB</b> <b>ESTADÍO IIC</b>	Metástasis ganglionares infradiafragmáticas.  Diámetro máximo de adenopatías $\leq 2\text{cms}$ . Diámetro máximo de las adenopatías $>2\text{cm}$ y $\leq 5\text{cms}$ . Diámetro máximo de las adenopatías $> 5\text{cms}$ .
<b><u>ESTADÍO III</u></b> <b>M:</b> <b>N:</b> <b>ESTADÍO IIIA</b> <b>ESTADÍO IIIB</b> <b>ESTADÍO IIIC</b>	Metástasis ganglionares supradiafragmáticas.  Mediastínicas. Ganglionares. Diámetro máximo de adenopatías $\leq 2\text{cms}$ . Diámetro máximo de las adenopatías $>2\text{cm}$ y $\leq 5\text{cms}$ . Diámetro máximo de las adenopatías $> 5\text{cms}$ .
<b><u>ESTADÍO IV</u></b> <b>L+:</b> <b>L1</b> <b>L2</b> <b>L3</b> <b>H+:</b> <b>Br+:</b> <b>Bo+:</b>	Metástasis viscerales. Sub-estadíos según la localización:  Afectación pulmonar. Según el número de metástasis: $\leq 3$ . $>3$ (ninguna mayor de 2 cms). $> 3$ (con una ó más $\geq 2$ cms). Afectación hepática. Afectación cerebral. Afectación ósea.

**Tabla 2.** Clasificación de la AJCC-TNM

<b>Tumor Primario</b>	Salvo en Tis y T4, el estadio T se determinará post-orquiectomía.
<b>pTx</b>	El tumor primario no pudo ser valorado.
<b>pT0</b>	No evidencia de tumor (ej. “burn out” ó tumor quemado).
<b>pTis</b>	Neoplasia intratubular (carcinoma in situ)
<b>pT1</b>	Tumor limitado al testículo y epidídimo sin invasión linfática/vascular; el tumor puede invadir la túnica albugínea pero no la túnica vaginalis.
<b>pT2</b>	Tumor limitado al testículo y epidídimo con invasión linfática/vascular ó tumor que invade la túnica albugínea con afectación de la túnica vaginalis.
<b>pT3</b>	El tumor invade el cordón espermático con ó sin invasión vascular ó linfática.
<b>pT4</b>	El tumor invade el escroto con ó sin invasión vascular/linfática.
<b>Ganglios regionales</b>	<b>N (clínico)</b>
<b>Nx</b>	Ganglios regionales no evaluables.
<b>N0</b>	No se identifican ganglios regionales patológicos.
<b>N1</b>	Metástasis ganglionar única, ó múltiples, $\leq 2$ cm de diámetro.
<b>N2</b>	Metástasis ganglionar única, ó múltiples, $> 2$ cm y $< 5$ cm.
<b>N3</b>	Masa ganglionar metastásica $> 5$ cm de diámetro.
	<b>pN(patológico)</b>
<b>pNx</b>	Ganglios regionales no evaluables.
<b>pN0</b>	No se identifican ganglios regionales patológicos.
<b>pN1</b>	Masa ganglionar metastásica $\leq 2$ cm. Cinco ó menos ganglios metastáticos, ninguno $> 2$ cm.
<b>pN2</b>	Masa ganglionar metastásica $> 2$ cm pero no $> 5$ cm, ó más de 5 ganglios metastáticos no $> 5$ cm, ó evidencia de extensión extracapsular.
<b>pN3</b>	Masa ganglionar metastásica $> 5$ cm de diámetro.
<b>Metástasis</b>	Metástasis a distancia.
<b>Mx</b>	No evaluables.
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia.
<b>M1</b>	<b>M1a:</b> Adenopatías no regionales ó metástasis pulmonares. <b>M1b:</b> Cualquier otro tipo de metástasis a distancia.
<b>Marcadores séricos</b>	Valores de BHCG en UI/ml y los de AFP en ng/ml; N representa el límite superior normal establecido por el laboratorio.
<b>Sx</b>	No disponibles ó no realizados.
<b>S0</b>	Valores dentro de los límites normales.
<b>S1</b>	$LDH < 1,5 \times N$ / y $BHCG < 5000$ / y $AFP < 1000$ .
<b>S2</b>	$LDH 1,5 - 10 \times N$ / ó $BHCG 5000-50000$ / ó $AFP 1000-10000$ .
<b>S3</b>	$LDH > 10 \times N$ / ó $BHCG > 50000$ / ó $AFP > 10000$ .

**Tabla 3.** Estadíos tumorales según la AJCC-TNM

<b><u>ESTADÍO 0</u></b>	pTis N0 M0
<b><u>ESTADÍO I</u></b> <b>ESTADÍO IA</b> <b>ESTADÍO IB</b> <b>ESTADÍO IS</b>	pT1-4 N0 M0 Sx pT1 N0 M0 S0 pT2-4 N0 M0 S0 Cualquier pT N0 M0 S1-3
<b><u>ESTADÍO II</u></b> <b>ESTADÍO IIA</b> <b>ESTADÍO IIB</b> <b>ESTADÍO IIC</b>	Cualquier pT N1-3 M0 Sx Cualquier pT N1 M0 S0 y cualquier pT N1 M0 S1. Cualquier pT N2 M0 S0 y cualquier pT N2 M0 S1. Cualquier pT N3 M0 S0 y cualquier pT N3 M0 S1.
<b><u>ESTADÍO III</u></b> <b>ESTADÍO IIIA</b>  <b>ESTADÍO IIIB</b>  <b>ESTADÍO IIIC</b>	Cualquier pT, cualquier N, M1, Sx. Cualquier pT, cualquier N, M1a, S0, y cualquier pT, cualquier N, M1a, S1. Cualquier pT, N1-3, M0, S2, y cualquier pT, cualquier N, M1a, S2. Cualquier pT, N1-3, M0, S3, y cualquier pT, cualquier N, M1, S3.



### 1.5.2 Clasificación pronóstica

Aproximadamente un tercio de los pacientes con tumores de células germinales se beneficiarán de tratamiento quimioterápico como primera estrategia terapéutica para enfermedad avanzada. Las altas tasas de curaciones y la toxicidad no despreciable de las combinaciones con cisplatino han dado lugar a un esfuerzo por parte de la mayoría de grupos con experiencia en el tratamiento de TCGs para definir variables que permitan estratificar a los pacientes en función del riesgo.

En 1991 se formó el *International Germ Cell Cancer Collaborative Group* (IGCCCG) con este objetivo. En primer lugar revisó retrospectivamente la experiencia de varios grupos pertenecientes a 10 países. Se incluyeron 5202 pacientes con TGNS y 660 con seminoma, todos ellos tratados con cisplatino, reclutados entre 1975 y 1990 en centros de Norteamérica, Europa, Nueva Zelanda y Australia. El objetivo del estudio fue crear un sistema de estadificación con carácter pronóstico, de fácil aplicación y que facilitara el manejo terapéutico de los pacientes con TCGs. Se identificaron una serie de variables como factores pronósticos independientes y se elaboró una clasificación pronóstica que ha sido posteriormente validada en la práctica clínica<sup>32</sup>. Esta clasificación incluye como factores pronósticos: histología (seminoma-no seminoma), localización del tumor primario, localización de las metástasis, y los niveles séricos de AFP, B-HCG y LDH; y define tres grupos de riesgo para los pacientes con TGNS y dos para los seminomas (Tabla 4).

Para los pacientes con tumor germinal primario extragonadal se ha elaborado un modelo pronóstico diferente<sup>24</sup>, pero actualmente no se utiliza de forma rutinaria.

**Tabla 4.** Internacional Germ Cell Cancer Collaborative Group Classification (IGCCCGC): clasificación de riesgo de los TCG avanzados.

	<b>Seminoma</b>	<b>No seminoma</b>
<b>Bajo riesgo</b>  56% no seminomas/ 90% seminomas. SLE 5 años 89% SG 5 años 92%	Ausencia de metástasis viscerales no pulmonares	AFP<1000 ng/mL HCG<5000 mIU/ml LDH<1.5 x N Metástasis no pulmonares (-) Tumor gonadal ó retroperitoneal
<b>Riesgo intermedio</b>  28% no seminomas/ 10% seminomas. SLE 5 años 75% SG 5 años 80%	Metástasis viscerales no pulmonares (+)	AFP 1000-10000ng/mL HCG 5000- 50000mIU/mL LDH 1.5-10 x N Metástasis no pulmonares (-) Tumor gonadal ó retroperitoneal
<b>Alto Riesgo</b>  16% no seminomas. SLE 5 años 41%. SG 5 años 48%.		Tumor mediastínico Metástasis no pulmonares(+) AFP>10000 HCG>50000 LDH>10 x N

## **1.6 TRATAMIENTO**

### **1.6.1 Tratamiento del tumor primario**

El primer tratamiento indicado en la neoplasia testicular es la orquiectomía inguinal programada. Sólo en caso de enfermedad metastásica y riesgo vital se justifica el tratamiento inicial con quimioterapia dejando la orquiectomía para un segundo tiempo. Los marcadores tumorales séricos se deben determinar antes de la cirugía y después de la misma para vigilar una adecuada evolución de su curva cinética.

### **1.6.2 Tratamiento de la neoplasia intratubular testicular/ carcinoma in situ**

A pesar del indudable potencial pre-maligno de este hallazgo histopatológico no existe consenso en cuanto a su manejo clínico. La actitud más extendida es la orquiectomía en pacientes con TIN unilateral y, en caso de TIN bilateral ó testículo único se deben discutir con el paciente las opciones de tratamiento: dosis bajas de radioterapia<sup>33</sup> (con los conocidos efectos deletéreos sobre la fertilidad que esto conlleva) ó seguimiento estricto. Dado el intervalo de tiempo entre el diagnóstico de TIN y el desarrollo de un tumor testicular, el seguimiento está justificado, sobre todo en pacientes que deseen tener descendencia.

Aquellos pacientes que van a recibir quimioterapia basada en cisplatino (como tratamiento adyuvante ó para enfermedad avanzada), dado que esta erradica las lesiones TIN en 2/3 de los pacientes, no requieren tratamiento específico salvo si el diagnóstico de neoplasia intratubular tiene lugar en una biopsia post-quimioterapia. En estos casos no se recomienda una segunda biopsia testicular al finalizar dicho tratamiento<sup>34</sup>.

### **1.6.3 Tratamiento de la enfermedad localizada**

En términos generales, los seminomas presentan una mayor radiosensibilidad y la radioterapia representa una herramienta muy importante en el manejo de los estadios iniciales. Por el contrario los TGNS responden de manera irregular al tratamiento radioterápico y se caracterizan por un curso clínico más agresivo, con mayor capacidad de diseminación. En este grupo la quimioterapia y la cirugía representan las armas fundamentales del tratamiento.

#### **1.6.3.1 Seminoma estadio I**

A pesar de la ausencia de enfermedad a distancia en la TC, existe un riesgo del 20% de enfermedad metastásica oculta en ganglios linfáticos regionales, con el subsiguiente riesgo de progresión sin tratamiento adyuvante tras la orquiectomía<sup>35</sup>. En cualquier caso la tasa de curaciones en el seminoma estadio I es cercana al 100%, lo cual se consigue gracias a tres estrategias terapéuticas post-orquiectomía: (1) Radioterapia adyuvante, (2) seguimiento estricto y tratamiento específico en caso de progresión, ó (3) quimioterapia adyuvante con carboplatino en monoterapia<sup>36</sup>. Las opciones estándar actuales son el tratamiento adyuvante con radioterapia y el seguimiento estricto; el tratamiento con carboplatino adyuvante en monoterapia ha sido estudiado recientemente en un estudio prospectivo randomizado<sup>37</sup> que ha demostrado su utilidad en la práctica clínica<sup>38</sup>.

#### **1.6.3.2 Seminoma estadios IIA/IIB**

El estadio clínico (EC) II abarca aproximadamente un 15% de los pacientes con seminoma. El tratamiento estándar es radioterapia post-orquiectomía. Con las técnicas modernas de irradiación este tratamiento consigue una supervivencia libre de enfermedad a los 6 años de 95% en EC-IIA y 89% en EC-IIB. La supervivencia global es cercana al 100%<sup>39</sup>. El volumen radiado debe incluir cadenas para-aórtica e iliaca ipsilateral, y las dosis totales recomendadas están entre 30-36 Gy. Tras la radioterapia es infrecuente que existan masas residuales y sólo está indicada su resección en caso de que aumenten de tamaño durante el seguimiento. Una alternativa para pacientes que rechacen la radioterapia, sobre

todo si el volumen de la masa retroperitoneal es importante, es el tratamiento quimioterápico con tres ciclos de cisplatino (P), etopósido (E) y bleomicina (B) a dosis estándar (BEP), ó, como alternativa, cuatro ciclos de EP.

### **1.6.3.3 TGNS estadio I**

El pronóstico de los TGNS E-I es bueno, con un índice de curaciones del 99% independientemente de la estrategia de tratamiento utilizada. La tasa de recidivas está en torno a un 30%. De ellas, el 96% ocurren en los primeros 2 años tras el diagnóstico inicial, y se localizan principalmente en retroperitoneo (54-78%), pulmón (13-31%) y con menos frecuencia otras localizaciones viscerales. La invasión vascular (IV) en el tumor primario es el factor de riesgo más importante para la recaída. Los pacientes con IV tienen un riesgo de recaída del 48% mientras que éste es sólo de un 14-22% en pacientes sin IV. Actualmente se recomienda una estrategia de tratamiento adaptada al riesgo<sup>40</sup>.

Los pacientes con bajo riesgo de recidiva (sin IV) son subsidiarios de seguimiento activo, que debe ser especialmente intenso durante los dos primeros años y debe prolongarse indefinidamente dada la posibilidad de recidiva tardía. De esta forma un 78-86% de los pacientes no requerirán ningún tratamiento adicional tras la orquiectomía y, dado que la quimioterapia es altamente eficaz en el tratamiento de las recidivas, la supervivencia global es superior al 95%. A los pacientes con alto riesgo de recidiva se les debe ofrecer un tratamiento con quimioterapia adyuvante con dos ciclos de BEP. Con esta estrategia un 97% de los pacientes permanecerán libres de recaída, y la tasa de curaciones es  $\geq 99\%$ . La desventaja del tratamiento adyuvante es que el 50% de los pacientes no hubiera requerido quimioterapia y son expuestos de forma innecesaria a los efectos secundarios del tratamiento. En cualquier caso, el seguimiento en pacientes con alto riesgo conlleva una tasa de recaídas del 48%, lo cual expone al paciente a un estrés psicológico no despreciable. En casos seleccionados en que el paciente rechaza el seguimiento ó la quimioterapia adyuvante, la linfadenectomía retroperitoneal con preservación de nervios simpáticos es una alternativa, aunque

no excluye un seguimiento posterior pues se producen hasta un 10% de recidivas<sup>41</sup>.

#### **1.6.4 Tratamiento de los tumores germinales no-seminomatosos IIA y IIB**

La tasa de curaciones de los E-IIA/B es cercana al 98%. Los pacientes con marcadores tumorales elevados se tratarán como pacientes con enfermedad avanzada según las recomendaciones del IGCCCG.

Los pacientes con ganglios retroperitoneales sospechosos y marcadores normales representan un subgrupo controvertido en cuanto a la actitud terapéutica más adecuada. Se plantean dos opciones: linfadenectomía retroperitoneal con preservación de nervios simpáticos (con la morbilidad que esta técnica conlleva), ó seguimiento. Este último deberá ser muy estricto, con re-evaluación de las lesiones sospechosas cada 6 semanas, y en caso de crecimiento tumoral sin elevación de marcadores será preciso realizar una exploración quirúrgica. Con la quimioterapia adyuvante en este subgrupo de pacientes se obtiene una baja tasa de recurrencias (entre el 0% y el 7%), pero implica un índice de pacientes sobretratados del 50-70%<sup>42</sup>.

#### **1.6.5 Tratamiento de los pacientes con enfermedad avanzada.**

El manejo terapéutico de los pacientes con enfermedad avanzada está basado en la clasificación pronóstica del IGCCCG. La estrategia de tratamiento se elegirá en función del grupo de riesgo al que pertenezca el paciente.

##### **1.6.5.1 Pacientes de buen pronóstico**

Los pacientes con TCG de buen pronóstico tienen una tasa de curación superior al 90%<sup>30</sup>. En esta población, el objetivo principal del tratamiento es mantener la eficacia con la mínima toxicidad posible. El tratamiento estándar consiste en la administración de tres ciclos de quimioterapia según el esquema BEP (bleomicina, etopósido y cisplatino) en cinco días, diseñado por el grupo de

la Universidad de Indiana<sup>43</sup>. Este esquema ha demostrado, tras múltiples estudios que han comparado diferentes dosis<sup>44,45</sup> y combinaciones de fármacos<sup>46,47</sup>, ser el que obtiene los mejores resultados en cuanto a eficacia, con el mejor perfil de toxicidad. En caso de que existan contraindicaciones para la administración de bleomicina la alternativa de tratamiento recomendada consiste en cuatro ciclos de cisplatino y etopósido (EP).

#### **1.6.5.2 Pacientes de pronóstico intermedio**

La clasificación del IGCCCG define un subgrupo de pacientes de riesgo intermedio que se caracteriza por una supervivencia del 80% a los cinco años. El tratamiento estándar en estos pacientes es quimioterapia: cuatro ciclos según el esquema BEP<sup>48</sup>. En todo caso, y con el objetivo de diseñar el modelo de tratamiento más efectivo para estos pacientes se recomienda, siempre que sea posible, incluirlos en ensayos clínicos prospectivos<sup>49</sup>.

#### **1.6.5.3 Pacientes de mal pronóstico**

Los pacientes con TCG de mal pronóstico representan una población con una supervivencia global a 5 años del 48% a pesar de tratamiento quimioterápico basado en cisplatino<sup>30</sup>. Para ofrecer al paciente un tratamiento óptimo y la máxima probabilidad de curación, debe ser tratado sin demora en un centro con experiencia en el manejo de TCGs de alto riesgo, donde pueda beneficiarse de un abordaje multidisciplinar en manos de profesionales expertos para el tratamiento de su neoplasia<sup>50</sup>.

El tratamiento estándar consiste en cuatro ciclos de BEP. Una alternativa igualmente efectiva es el tratamiento con cuatro ciclos de etopósido, ifosfamida y cisplatino (VIP). Este último esquema conlleva una mayor mielotoxicidad aguda y por ello no se considera estándar, pero, en pacientes respiratoriamente comprometidos, evita la posible toxicidad pulmonar de la bleomicina<sup>51</sup>.

En el caso de pacientes con mal estado general (<50% según el índice de Karnofsky) con enfermedad metastásica visceral grave a nivel pulmonar,

hepático, y/o cerebral, algunos autores han sugerido un ciclo corto de quimioterapia a dosis reducidas previo al tratamiento quimioterápico a dosis completas<sup>24</sup>.

Durante los últimos años han surgido una serie de estrategias con el objetivo de mejorar los resultados terapéuticos en los pacientes de alto riesgo. Estas incluyen el aumento en la dosis de cisplatino, la introducción de nuevos fármacos ó el uso de regímenes alternantes y/o secuenciales en el tratamiento inicial<sup>52</sup>, y la aplicación de altas dosis de quimioterapia con soporte hematológico (TASPE) tras una fase de inducción convencional<sup>53</sup>. Hasta el momento los resultados de estos planteamientos no avalan su uso en la práctica clínica.

Mención aparte merece el tratamiento de los pacientes con metástasis cerebrales. Aproximadamente un 10% de los pacientes con TCGs presentan metástasis a nivel de SNC al diagnóstico, con una probabilidad de supervivencia a largo plazo en torno al 30-40%, a diferencia de aquellos pacientes que las desarrollan secundariamente durante el tratamiento ó en la recidiva, que tienen una supervivencia a cinco años que no supera el 5%. La secuencia óptima de tratamiento aun no está bien definida, pero parece que la asociación de radioterapia craneal concomitante ó secuencial al tratamiento quimioterápico sistémico mejora el pronóstico global de estos pacientes<sup>54</sup>.

#### **1.6.5.4 Monitorización de la respuesta al tratamiento**

La evolución de los valores séricos de los marcadores tumorales durante el tratamiento y al final de la quimioterapia es fundamental para una adecuada valoración de la respuesta y será la base de la actitud terapéutica posterior<sup>55</sup>. Es necesario una determinación de marcadores séricos inmediatamente antes de cada ciclo y tres semanas después de finalizado el tratamiento, así como un re-estadiaje radiológico al finalizar la primera línea de quimioterapia. En aquellos pacientes en los que el descenso de los marcadores sea lento ó ante la sospecha de progresión clínica, se debe adelantar dicha re-evaluación para una adecuada re-orientación del tratamiento de primera línea.



En el caso de que se documente un aumento de marcadores durante la quimioterapia ó inmediatamente después de la misma ha de iniciarse tratamiento de rescate, aunque no se objetive progresión radiológica simultánea<sup>56</sup>. En cualquier caso, para los pacientes que presentan progresión biológica durante un tratamiento de primera línea basada en cisplatino ó en las cuatro semanas siguientes, el pronóstico es muy malo<sup>57</sup>.

Si durante el tratamiento quimioterápico, a pesar de una adecuada respuesta biológica, se objetiva crecimiento de las lesiones radiológicas lo más probable es que nos encontremos con la presencia del síndrome del “growing” teratoma, en cuyo caso está indicada una resección competa de todas las lesiones tumorales inmediatamente después de finalizar la primera línea de tratamiento. Sólo será necesaria la cirugía antes de completar la quimioterapia en caso de progresión tumoral radiológica rápida<sup>58</sup>.

En todos aquellos pacientes en los que persista una ligera elevación de los marcadores tumorales una vez completado el tratamiento quimioterápico se deberá realizar resección de las masas residuales.

### **1.6.5.5 Tratamiento de la enfermedad residual**

Entre un 30 y un 50% de los pacientes con TCGs avanzados tratados con quimioterapia, a pesar de alcanzar una respuesta completa biológica, presentarán enfermedad residual<sup>59</sup>. El manejo de estas situaciones difiere en cada grupo histológico y no está libre de controversia.

#### **1.6.5.5.1 Seminoma**

En pacientes diagnosticados de seminoma avanzado y masa residual post-tratamiento con quimioterapia ó radioterapia es necesario un seguimiento estricto con técnicas de imagen y determinaciones seriadas de marcadores tumorales<sup>60</sup>. En caso de masa residual mayor de 3 cm está indicada la realización de un PET, dado que esta prueba, realizada cuatro semanas después del último tratamiento quimio- ó radioterápico, es altamente predictiva de tumor viable<sup>61</sup>. Aquellos pacientes en

los que el resultado del PET sea positivo serán subsidiarios de tratamiento quimioterápico complementario. Si el resultado del PET es negativo ó se trata de masas residuales menores de 3 cm está indicada la observación estricta.

En pacientes con progresión de la masa residual tras una primera línea de quimioterapia es necesario un diagnóstico anatomopatológico de confirmación antes de iniciar un tratamiento quimioterápico de rescate para seminoma refractario<sup>62</sup>.

#### **1.6.5.5.1 No- Seminoma**

Hasta el momento ningún modelo pronóstico ó prueba de imagen ha demostrado su validez en la predicción de la histología de las masas residuales. En este contexto la mayoría de los estudios realizados recomiendan la resección de cualquier masa residual en los pacientes con TCGNS que han conseguido la normalización de los marcadores tumorales tras concluir el tratamiento quimioterápico, aunque en pacientes con lesiones residuales  $\leq 1\text{cm}$  en retroperitoneo está discutida la realización de una linfadenectomía retroperitoneal<sup>63</sup>. Cuando se analiza la histología de la masa residual resecada se objetiva que sólo hay tumor viable en un 15% de los casos, en un 35% se encuentra teratoma y en el 50% restante necrosis y/o fibrosis<sup>64</sup>. Cuando hay masas residuales en varias localizaciones se ha de tomar una decisión individualizada en función del número y extensión de las mismas así como de la posible morbilidad quirúrgica prevista. En general, se recomienda la resección de todas las lesiones ya que se encuentra discordancia en la histología de las diversas masas hasta en un 50% de los casos<sup>64</sup>. En el caso de encontrarse necrosis en la primera masa residual resecada, sólo si la dificultad técnica y la morbilidad quirúrgica prevista son elevadas, se considera el seguimiento estricto de las lesiones restantes como alternativa terapéutica válida. Debido a la importante morbilidad aguda relacionada con el tratamiento, la cirugía de masas residuales debe realizarse en centros especializados.

Si el análisis histopatológico de la pieza extirpada muestra fibrosis, necrosis ó teratoma, no es necesario administrar más tratamiento quimioterápico, pues sólo

un 10% de estos pacientes presentarán recidiva. Si por el contrario se objetiva tumor viable habitualmente se indican dos ciclos complementarios de quimioterapia basada en cisplatino<sup>65</sup>.

#### **1.6.5.6 Tratamiento de los TCGs refractarios ó recurrentes**

En aquellos pacientes que recaen ó progresan tras una primera línea de tratamiento, la localización e histología del tumor primario, la respuesta a la primera línea de tratamiento, la duración de las remisiones previas, y el valor de los marcadores tumorales en el momento de la progresión ó recaída serán indicadores pronósticos y orientarán la actitud terapéutica a seguir<sup>55</sup>.

##### **1.6.5.6.1 Seminoma**

Los pacientes que recaen tras un primer tratamiento con radioterapia alcanzan una tasa de curaciones >90% con tratamiento quimioterápico basado en cisplatino (BEP). Sin embargo, el tratamiento con cuatro ciclos de cualquiera de los esquemas habituales (VIP; VeIP: vinblastina, ifosfamida y cisplatino; TIP: paclitaxel, ifosfamida y cisplatino), a dosis convencionales, utilizado en la recaída tras una primera línea de quimioterapia con BEP solo obtiene en torno a un 50% de largos supervivientes<sup>66</sup>. En el momento actual no se dispone de datos suficientes para valorar el papel de la quimioterapia a altas dosis en seminomas recidivantes ó refractarios y se recomienda incluir a estos pacientes en ensayos clínicos.

##### **1.6.5.6.2 Tumores germinales no seminomatosos**

En 1999 Fossa y cols. publicaron un estudio<sup>67</sup> en el que analizaban un grupo de 795 pacientes con TCGs avanzados en el que hubo 164 recidivas. Tras la recaída los pacientes recibieron distintos tratamientos de rescate con combinaciones de quimioterapia basadas en cisplatino. Un análisis multivariante permitió definir tres factores con impacto en la supervivencia: intervalo libre de progresión, grado de respuesta a quimioterapia obtenido en primera línea, y nivel de marcadores séricos en el momento de la recaída. En función de dichos factores se establecieron dos grupos pronósticos:

*Mal pronóstico.*- Incluye a pacientes con intervalo libre de progresión inferior a dos años, que no obtuvieron una respuesta completa con el tratamiento inicial y que presentan marcadores elevados (AFP>100 ng/ml y/o BHCG >100 UI/ml) en el momento de la recaída. La mediana de supervivencia de estos pacientes fue de 7 meses en el estudio citado anteriormente, sin superar ningún paciente los tres años de supervivencia. En este caso la respuesta a los tratamientos considerados convencionales es habitualmente escasa, así como la respuesta a las altas dosis de quimioterapia.

*Buen pronóstico.*- aquellos pacientes que reúnen dos ó menos de los factores de riesgo. Globalmente su tasa de supervivencia a los dos años es del 56% y a los 5 años del 47%.

Aún así el manejo terapéutico de los TGNS refractarios es controvertido. El grupo de la universidad de Indiana ha publicado buenos resultados en cuanto a tasa de respuestas completas con un tratamiento de dos ciclos de quimioterapia a altas dosis en pacientes que presentaron recaída tras una respuesta completa a la primera línea de tratamiento quimioterápico<sup>68</sup>; basados en la quimiosensibilidad previa dichos investigadores abogan por el tratamiento con altas dosis de quimioterapia en el subgrupo de pacientes de buen pronóstico y proponen ofrecer a los pacientes de mal pronóstico ensayos clínicos prospectivos con nuevas combinaciones de fármacos. Por el contrario, Motzer et al<sup>69,70</sup>, del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (NY), basado entre otros en el estudio de Kondagunta et al<sup>71</sup> con TIP como tratamiento de segunda línea en TGNS, es partidario de ofrecer un tratamiento con quimioterapia a dosis convencionales a los pacientes de buen pronóstico y reservar el tratamiento con altas dosis para aquellos pacientes de peor pronóstico. Actualmente hay varios estudios en curso que en un futuro nos ayudarán a un abordaje terapéutico más preciso de estos pacientes.

### **1.6.5.6.3 Cirugía de rescate**

Sólo está indicada en el caso de progresión biológica tras tratamiento de rescate y ausencia de otras opciones de quimioterapia eficaces. Se debe realizar 4-6 semanas después de normalizados los marcadores ó una vez que estos se estabilizan en el nivel más bajo, y solo si es posible una resección tumoral completa. Con esta estrategia se obtienen hasta un 25% de largos supervivientes<sup>72</sup>. El tratamiento quimioterápico tras este tipo de cirugía no ha demostrado beneficio en la supervivencia y por lo tanto no está indicado.

### **1.6.5.6.4 Tratamiento de las recaídas tardías**

Siempre que técnicamente sea posible, aquellos pacientes con recaídas tardías y marcadores negativos deben tratarse con cirugía radical. Dados los pobres resultados de la quimioterapia en este tipo de recaídas también la cirugía será la primera opción de tratamiento en caso de lesiones pequeñas, completamente resecables y marcadores elevados<sup>73</sup>. Si las lesiones no son resecables completamente está indicado el tratamiento quimioterápico de rescate, tras la confirmación histológica. Si el paciente responde a dicho tratamiento, la resección quirúrgica ha de realizarse posteriormente siempre que sea posible<sup>74</sup>, y en su defecto está indicada la radioterapia para la enfermedad refractaria localizada.

### **1.7 QUIMIOSENSIBILIDAD DE LOS TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES Y POSIBLES MECANISMOS DE QUIMIO-RESISTENCIA.**

A finales de los años cincuenta ya se tenía constancia de la buena respuesta que tenían los tumores de células germinales a tratamientos con un solo citostático, incluyendo alguna remisión completa de larga duración. Pero fue la incorporación del cisplatino en 1975 al tratamiento quimioterápico habitual con vinblastina y bleomicina<sup>75</sup> el hecho que marcó un cambio radical en la historia del manejo y pronóstico de estos tumores, y no tanto por el importante número de respuestas alcanzadas (que a fin de cuentas se podían observar también en otras neoplasias como el cáncer de pulmón de célula pequeña) sino por la duración de las mismas y en definitiva por el alto índice de curabilidad observado a partir de entonces en estas neoplasias. Aun así, a pesar de los grandes logros obtenidos en los últimos años en el tratamiento de los TCGs, un 20-30% de los pacientes fallecen por esta enfermedad. La causa de la extraordinaria quimio-sensibilidad de este tipo de tumores y los mecanismos de quimio-resistencia que desarrollan los tumores refractarios son aún desconocidos.

Multitud de estudios han profundizado en las bases biológicas y moleculares del comportamiento de los TCGs. Los diferentes hallazgos documentados en la bibliografía se podrían agrupar en:

1. Mecanismos que modifican la concentración intracelular de cisplatino.
2. Alteración de las vías de reparación del ADN.
3. Disfunción de los sistemas reguladores de apoptosis.
4. Factores de crecimiento celular y receptores tipo tirosina-quinasa.
5. Proteínas moduladoras del ciclo celular.

### **1.7.1 Mecanismos que modifican la concentración intracelular de cisplatino**

La concentración intracelular de cisplatino (CDDP), y por lo tanto su efecto citotóxico, puede verse alterada por cambios en su captación, expulsión al medio extracelular ó detoxificación. Según varios estudios, el cisplatino entra en las células mediante difusión pasiva ó facilitada, y se han descrito proteínas transportadoras responsables de su expulsión al medio extracelular; cualquier circunstancia que conlleve una sobreexpresión de estas bombas transportadoras podría dar lugar a resistencia al CDDP<sup>76</sup>.

La mayoría de los TCGs invasivos carecen de sistemas de expulsión de CDDP intracelular, y en general muestran bajos niveles de Glutation-S-Transferasa (GST), principal enzima implicada en la detoxificación del fármaco<sup>77</sup>, lo cual podría contribuir en parte a la quimiosensibilidad de estas neoplasias.

### **1.7.2 Vías de reparación del ADN**

El segundo grupo de factores de resistencia que ha sido estudiado incluye los mecanismos implicados en la reparación del ADN. El cisplatino se une al ADN mediante enlaces covalentes y favorece la formación de acúmulos de material genético que impiden la separación de la doble hélice y por lo tanto también la síntesis, replicación y transcripción. Si la célula tumoral es incapaz de reparar el daño producido por el fármaco citotóxico aumentan las posibilidades de apoptosis.

Entre estos mecanismos la vía de reparación por excisión de nucleótidos (“Nucleotide Excision Repair”.- NER) es fundamental para la reparación del ADN dañado tras ser expuesto a cisplatino. Se ha observado que en líneas celulares derivadas de tumores de células germinales el CDDP tarda mucho en ser retirado del ADN genómico lo cual implicaría una baja capacidad intrínseca del sistema NER en estas células<sup>78</sup>. Este hecho se ha asociado a bajas concentraciones

de la proteína del Xeroderma Pigmentado grupo A (XPA) y del complejo formado por el “Excision Repair Cross Complementing 1” (ERCC1) y la endonucleasa del Xeroderma Pigmentado tipo F (XPF). Además, en un estudio publicado en 1999, Koberle et al<sup>79</sup> fueron capaces de restaurar la capacidad NER de células derivadas de tumores testiculares añadiendo la proteína XPA a los extractos tumorales. Estos hallazgos sugieren que las terapias moleculares dirigidas a bloquear dicha proteína podrían aumentar la quimiosensibilidad de TCGs resistentes. En otras neoplasias, como en el cáncer de pulmón (microcítico y no microcítico) ó en el cáncer de cervix, los valores de ERCC1 determinados por técnicas de mARN cuantitativo se han asociado con patrones de resistencia a cisplatino, e incluso se han demostrado diferencias significativas en la supervivencia libre de progresión tumoral con tratamientos diseñados en función del ERCC1<sup>80,81</sup>.

Otro sistema de reparación del ADN dañado por cisplatino es el “Mismatch Repair pathway” (MMR), implicado en enlazar el reconocimiento celular del ADN alterado con el inicio de la cascada apoptótica. Las alteraciones en factores del MMR provocan inestabilidad de las secuencias repetitivas cortas de ADN llamadas microsatélites, por lo tanto el análisis de la inestabilidad de los microsatélites nos aporta información sobre el funcionamiento de este sistema. Varios estudios han objetivado que la mayoría de los TCG presentan microsatélites estables; sin embargo, entre los TCGs refractarios al tratamiento con cisplatino algunas series han descrito hasta un 45% de inestabilidad en los microsatélites<sup>82</sup>, lo cual sugiere que un fallo en el inicio de la cascada apoptótica debida al funcionamiento defectuoso del MMR puede contribuir a la quimio-resistencia.

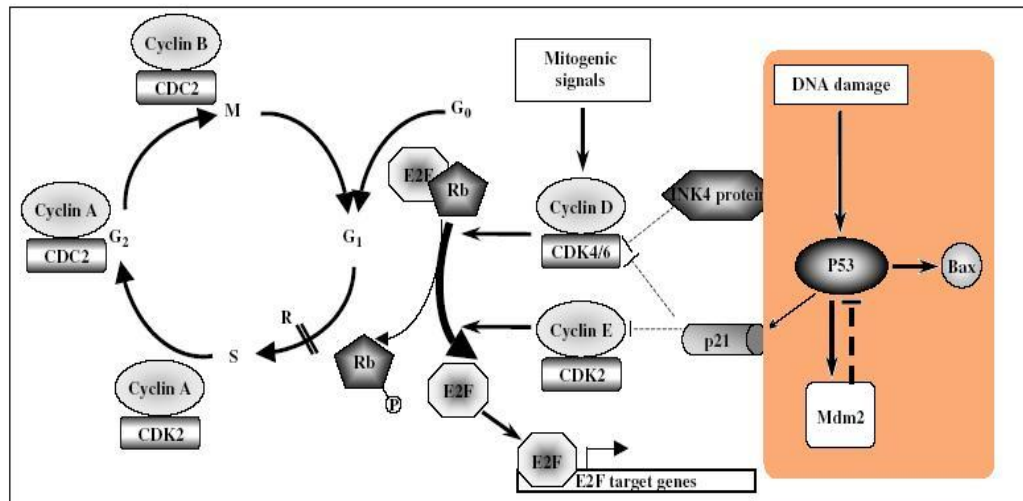
### **1.7.3      Sistemas reguladores de apoptosis**

La mayor parte de los fármacos citotóxicos eliminan poblaciones celulares mediante la activación de vías que conducen a eventos apoptóticos. La quimioterapia representa una señal pro-apoptótica, pero el resultado final de su actuación depende de la integridad y el buen funcionamiento de las cascadas de señales que terminarán llevando a la célula a la muerte celular programada. En las

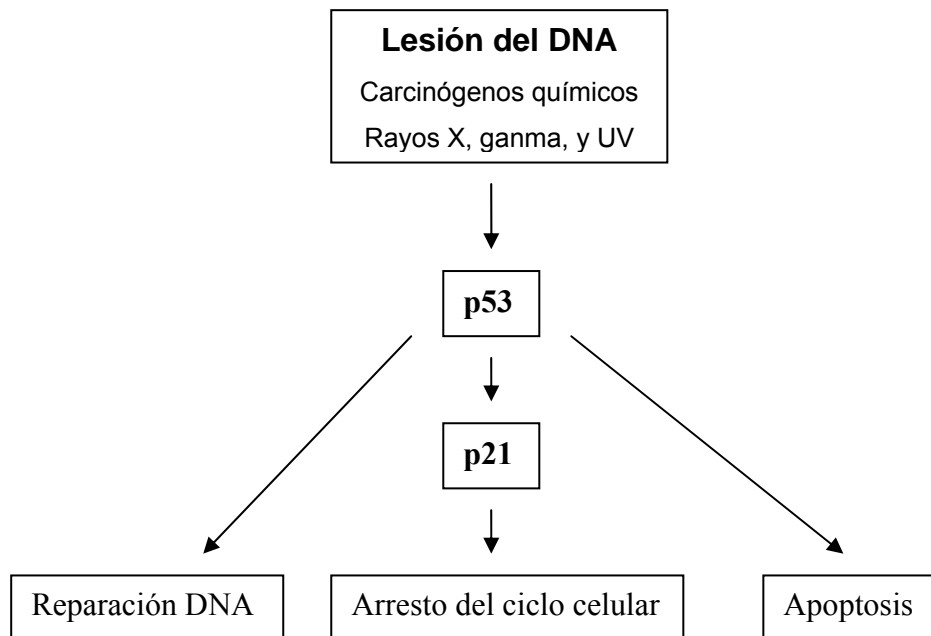


neoplasias humanas los genes bcl-2, TP53 y MDM-2, y sus proteínas correspondientes, tienen un papel clave en la regulación de la apoptosis.

**Fig 3a. Ciclo celular y vías de regulación de apoptosis (tomado de la revisión de Spierings et al<sup>83</sup>).**



**Fig 3b. Vías de regulación de apoptosis**



### 1.7.3.1 TP53

El TP53 es el gen que con más frecuencia se encuentra mutado en tumores humanos. Es un gen supresor cuya actividad es crucial para la regulación del ciclo celular y el control de la respuesta a agresiones, pero su papel en la quimiosensibilidad de las células tumorales humanas aún no está claro. Varios equipos de investigación han estudiado la relación entre TP53 y quimio-resistencia. Entre ellos destaca el estudio de O'Connor et al<sup>84</sup> que, comparando líneas celulares tumorales que expresaban TP53 nativo ("wild-type") con otras que presentaban una mutación en el mismo gen, demostró una correlación positiva entre la resistencia a cisplatino y la presencia de TP53 mutado. En cambio, De Feudis et al, en un panel de nueve líneas celulares de cáncer de ovario no evidenciaron correlación entre la sensibilidad a cisplatino ó a paclitaxel y el estado del TP53<sup>85</sup>. Parece por lo tanto que la implicación del status del gen TP53 en la sensibilidad a fármacos puede ser específica para cada tipo tumoral.

En la gran mayoría de los TCGs humanos el gen TP53 se encuentra en su forma nativa ("wild-type") y la proteína p53 aparece sobre-expresada<sup>86</sup>. Este hallazgo inicialmente se relacionó con la alta quimiosensibilidad de dichos tumores. Sin embargo, estudios recientes han cuestionado el valor de la expresión de p53 nativo en la respuesta a tratamientos quimioterápicos. Cabe destacar el estudio de Kersemaeckers y cols<sup>87</sup>, en el que hace una crítica metodológica de los trabajos publicados anteriormente y analiza una serie propia, concluyendo que los niveles de TP53 nativo y de proteína p53 expresada (detectada en tejido parafinado mediante técnicas de inmunohistoquímica) no se relacionan directamente con la sensibilidad al tratamiento, por lo que proponen la existencia de mecanismos alternativos de resistencia.

Disponemos de poca información sobre la funcionalidad de la proteína p53 expresada y sobre los circuitos reguladores de su función. En los TCGs algunos estudios han demostrado que aquellos tumores que presentan secuestro citoplasmático de la proteína p53 tienen una menor respuesta al daño inducido por el tratamiento citotóxico. Además, la acumulación citoplasmática de p53 es un

factor independiente de mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer<sup>88</sup>. Algunos estudios “in vitro” atribuyen un papel determinante en la resistencia tumoral al tratamiento a mutaciones en las vías reguladoras que influyen en p53. Curtin y cols<sup>89</sup> sugieren en un estudio realizado en líneas celulares que el ácido retinoico puede modificar la sensibilidad celular a la apoptosis inducida por cisplatino, siendo ésta mayor en aquellas células que sobre-expresan su receptor. Por último cabe destacar la importancia de la ligasa “mouse-double-minute-2” (mdm2) como reguladora de la actividad de la proteína p53 a la que dedicaré a continuación un apartado más extenso.

### **1.7.3.2 MDM-2**

El gen “mouse double minute-2” (MDM-2) actúa a nivel celular como un proto-oncogen. Es responsable de la expresión de una proteína ligasa del mismo nombre que, a través de un sistema de retroalimentación negativa, estimula la destrucción de la proteína p53 inhibiendo su función pro-apoptótica y activando la tumorigénesis. La sobre-expresión de la proteína mdm-2, en la mayoría de los casos mediada por amplificación genética, se ha relacionado con resistencia a quimioterapia y mal pronóstico en varias neoplasias malignas<sup>90,91</sup>. Datta y cols<sup>92</sup> examinaron la expresión de mdm-2 en una serie de biopsias de tumores de células germinales y objetivaron sobre-expresión tisular en la mayoría de los tumores invasivos y tan solo en un 7% de las lesiones pre-malignas con carcinoma in situ (CIS). Dichos resultados sugieren una implicación de esta ligasa en la progresión hacia el fenotipo invasivo de los tumores de células germinales. Otro estudio que investiga el papel de mdm-2 en estas neoplasias es el realizado por Eid y cols<sup>93</sup>, en él analizan 81 muestras parafinadas de tumores germinales y encuentran que su expresión es alta en teratomas, tumores del seno endodérmico y coriocarcinomas, pero no en seminomas ó carcinomas embrionarios. Además, y como hallazgo más significativo, observan una relación directamente proporcional entre el nivel de expresión de la proteína (determinado mediante técnicas de inmunohistoquímica) y el estadio tumoral, lo cual implica una relación directa con el grado de agresividad y pronóstico del tumor. De hecho, en dicho trabajo, su sobre-expresión en estadios I fue predictiva del desarrollo de metástasis en la evolución de la enfermedad.

### **1.7.3.3 Bcl-2**

El gen Bcl-2 se ha asociado con procesos inhibitorios de la apoptosis. Su sobre-expresión se ha relacionado con protección celular frente a estímulos apoptóticos y por lo tanto con una peor respuesta a los tratamientos citotóxicos. Recientemente se ha objetivado que Bcl-2 es un miembro más de una familia más amplia de genes que codifican una serie de proteínas que van a actuar en combinación para modular las vías apoptóticas<sup>94</sup>. Dentro de esta familia se han descrito proteínas inductoras de apoptosis (Bax, Bak y Bid) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL y Bcl-W). Inicialmente la presencia de concentraciones bajas de Bcl-2 y altas de Bax se relacionó con la quimiosensibilidad de los TCGs<sup>95</sup>. Sin embargo, estudios recientes como el de Arriola y cols.<sup>96</sup> realizado en líneas celulares de TCGs, ponen de manifiesto que la acción moduladora de Bcl-2 es mucho más compleja, y que en ocasiones su sobre-expresión puede inducir apoptosis a través de la regulación negativa de Bcl-XL, lo cual sugiere que la acción de estas proteínas es probablemente específica de cada tumor.

### **1.7.4 Receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina-quinasa**

Se ha estudiado ampliamente la relación entre quimiosensibilidad y las denominadas “señales de supervivencia”. Estas son señales, generalmente extracelulares, que activan mecanismos intracelulares a través de los cuales la célula escapa de la apoptosis inducida por el tratamiento citotóxico. Este tipo de “cascadas” con frecuencia está mediado por receptores trans-membrana cuyo dominio intracelular posee una actividad tirosina-quinasa clave en la transmisión de la señal. Dentro de la familia de los “receptores tirosin-quinasa” se encuentran los receptores de factores de crecimiento (“epidermal growth factor receptors”.- EGFR) y el receptor trans-membrana derivado del proto-oncogen c-Kit.

#### **1.7.4.1 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

El EGFR es un receptor tipo tirosin-quinasa que tras la unión de sus ligandos, EGF y TGF $\alpha$ , activa una cascada de señal implicada en procesos celulares fundamentales como son la proliferación, diferenciación, apoptosis, migración y adhesión. En determinados tipos de cáncer se ha observado una relación entre su sobre-expresión y un peor pronóstico tumoral<sup>97</sup>. Varios estudios con reducido número de pacientes han evaluado la expresión de esta proteína en TCGs, sin que ninguno de ellos haya determinado su papel como marcador de quimio-resistencia ó pronóstico tumoral<sup>98</sup>.

#### **1.7.4.2 Erb-B2**

Erb-B2 ó Erb-B2neu es una glicoproteína perteneciente a la familia de receptores tirosina-quinasa con importantes similitudes estructurales con el EGFR. A diferencia de este, no tiene ningún ligando conocido y se activa mediante la formación de dímeros (homodímeros ó heterodímeros) con otros receptores de su misma familia (erbB1, erbB2, erbB3 ó erbB4). Dicha activación pone en marcha una cascada de reacciones que inducen crecimiento, división, migración y adhesión celular. Este receptor ha sido ampliamente estudiado en cáncer de mama, donde se ha puesto de manifiesto su sobre-expresión en un 20-30% de los casos y su valor como factor pronóstico negativo y como factor predictivo de respuesta a tratamientos hormonales y quimioterápicos. La expresión de Erb-B2 ha sido evaluada en TCGs en algunos estudios con escaso número de pacientes y resultados contradictorios<sup>99</sup>.

#### **1.7.4.3 C-KIT**

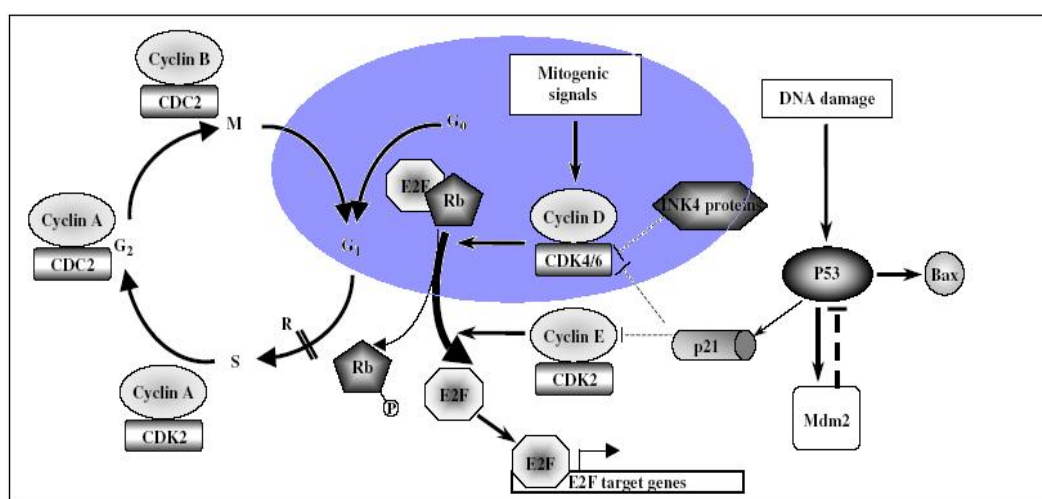
El proto-oncogen c-kit codifica un receptor transmembrana tipo tirosina-quinasa (KIT) que, tras unirse a su ligando específico (Stem Cell Factor; SCF) sufre un proceso de dimerización y fosforilación iniciando una cascada de eventos que induce activación de proteínas anti-apoptóticas y de proliferación celular. El sistema SCF-KIT tiene un papel fundamental en la espermatogénesis, encontrándose su expresión en células germinales fetales hasta las 12 semanas de

gestación pero no después<sup>100</sup>. Además la proteína se ha detectado en CIS y células de seminoma, lo cual indica una posible implicación de este receptor en la oncogénesis. Estudios recientes han analizado la expresión de KIT en células de TCGs y la frecuencia de mutaciones activadoras del gen<sup>101</sup>. Cabe destacar el estudio de Madani y cols.<sup>98</sup> que confirma la presencia de diversas mutaciones de c-kit en estirpes seminomatosas tumorales, y discute la posible implicación de estas en la tumorigénesis.

### 1.7.5 Proteínas moduladoras del Ciclo Celular

La génesis tumoral implica una alteración en los procesos fisiológicos que intervienen en la regulación del ciclo celular y en los mecanismos de diferenciación. En los tumores de células germinales varios trabajos han demostrado una dis-regulación del punto de restricción G1-S y a raíz de los mismos se han estudiado varias proteínas implicadas en su control como son las Ciclinas D1 y D2, y los inhibidores de quinasas ciclina dependientes, así como los genes responsables de su expresión. Dichas proteínas tienen un papel significativo tanto en la diferenciación normal como en la transformación tumoral.

**Fig 4. Ciclo celular y proteínas moduladoras. Ciclinas D (tomado de la revisión de Spierings et al<sup>83</sup>).**



### **1.7.5.1 Ciclina D1 y gen del Retinoblastoma (Rb)**

La fosforilación de la proteína codificada por el gen Rb es fundamental para la progresión en el ciclo celular: de ella depende el paso de fase G1 a fase S a través del punto de restricción. Varios estudios han encontrado un déficit significativo de expresión del gen Rb tanto a nivel de mRNA como a nivel protéico, en seminomas y no-seminomas<sup>102</sup>. Además de alteraciones directas del Rb, en los TCGs se han observado también alteraciones en la expresión de diversos reguladores de Rb como son las quinasas ciclina-dependientes CDK2, CDK4, y CDK6, y las ciclinas D1, D2, D3 y E. En un estudio publicado por Schmidt y cols.<sup>103</sup> se demostró una regulación positiva del complejo ciclina D-CDK4 en todos los seminomas y no seminomas estudiados; dado que la sobreexpresión del complejo ciclina D1-CDK4 puede acelerar la entrada en fase S y promover la progresión del ciclo celular independientemente de Rb/E2F<sup>104</sup>, estos resultados sugieren que en tumores testiculares, en ausencia de función Rb, los complejos ciclina D/CDK4 pueden actuar como promotores del ciclo celular. Puesto que las células en fase S son las dianas fundamentales de los agentes lesivos para el ADN (como el cisplatino y la radioterapia), un mejor conocimiento de las ciclinas del grupo D puede ayudarnos a determinar las causas de la exquisita sensibilidad de estas neoplasias e incluso a predecir la respuesta al tratamiento en estos pacientes.

El gen de la ciclina D1 (CCND1) se clonó en 1991 en el cromosoma 11q13, e inicialmente su defecto se consideró la causa del adenoma paratiroideo<sup>105</sup>. Estudios recientes han demostrado que CCND1 es un proto-oncogen cuya sobreexpresión, ya sea por amplificación ó reordenamiento, contribuye a la proliferación celular no controlada en múltiples tipos de tumores como son los linfomas del manto (oncogen Bcl1), el carcinoma de cabeza y cuello, los gliomas<sup>106</sup> y el cáncer de mama. En el caso de este último se ha demostrado una relación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión tisular de ciclina D1 en muestras tumorales (inmunohistoquímica) y una mayor supervivencia global y supervivencia específica<sup>107</sup>. En los tumores de células

germinales se encuentran sobre-expresadas las ciclinas D1 y D2, y sus correspondientes genes<sup>108</sup>.

#### **1.7.5.2 Ciclina D2 e isocromosoma 12 (i12p)**

La ciclina D2 tiene un papel importante en la proliferación celular y su expresión está estrictamente regulada a lo largo del ciclo celular. Unida a las ciclinas dependientes de quinasas 4 ó 6 (cdk4, cdk6) forma un complejo enzimático activo que regula la fosforilación de la proteína Rb y facilita el paso celular a través del punto de restricción de G1<sup>109</sup>. Su sobre-expresión tisular se relaciona con un mayor riesgo de progresión y mal pronóstico en cáncer gástrico<sup>110</sup>, y con una mayor tasa de proliferación en linfomas Hodgkin<sup>111</sup>.

Varios estudios sugieren su participación en la espermatogénesis dado que su expresión está muy controlada durante el desarrollo normal de las células germinales<sup>112</sup> y la delección del gen de la ciclina D2 en ratones transgénicos conlleva un descenso en la masa testicular y en el recuento de espermatozoides<sup>113</sup>. Todo ello hace de este gen un buen candidato para estar implicado en el desarrollo del cáncer testicular.

El análisis molecular y genético de los TCGs ha aportado una gran información de cara a entender el mecanismo de transformación de las células germinales. Prácticamente el 100% de estos tumores presenta un aumento del número de copias del brazo corto del cromosoma 12 (12p), en forma de una ó más copias de i(12p) (isocromosoma 12p formado por la fusión de dos brazos cortos del cromosoma 12) ó como duplicaciones en tandem del 12p in situ ó translocadas en cualquier otra parte del genoma<sup>114</sup>. Este marcador cromosómico se ha observado incluso en células de CIS/TIN, y se asocia al fenotipo invasivo de los TCGs<sup>115</sup>, lo cual sugiere que se trata de uno de los primeros pasos hacia la transformación tumoral. A través de estudios moleculares se han identificado los genes localizados en el brazo corto del cromosoma 12 y entre ellos se encuentran los genes de transformación CCND2 (responsable de la ciclina D2), FGF6, TEL, KIP1, KRAS, y PTHLH. Estos genes han sido sistemáticamente analizados en líneas celulares derivadas de TCGs y muestras de biopsias tumorales; estudios



basados en la cuantificación del mRNA han demostrado una mínima expresión de FGF6, TEL y PTHLH, una expresión variable de KRAS, y KIP1, y una marcada elevación de CCND2 a nivel de mRNA, por lo cual se propuso la posible implicación de este gen en el proceso de transformación tumoral en los TCGs<sup>116</sup>. El análisis posterior por inmunohistoquímica de muestras tumorales y tejido testicular normal evidenció que en células germinales de tejido testicular normal la ciclina D2 es prácticamente indetectable, mientras que en CIS/TIN y seminomas está sobre-expresada, y en no-seminomas muestra un patrón focal que depende de la diferenciación histológica. Estos datos de nuevo sugieren un papel crucial del gen CCND2 y la ciclina D2 en la transformación maligna de las células germinales<sup>117</sup>.

La relación entre la ciclina D2 y la resistencia al tratamiento citotóxico sistémico en TCGs está menos estudiada. Algunos trabajos recientes han demostrado una asociación entre inestabilidad microsatélite y resistencia a quimioterapia en tumores de células germinales<sup>118</sup>, mas aún, parece que el patrón de pérdidas y ganancias de ADN no es aleatorio sino que existen regiones genómicas particulares más sensibles a sufrir inestabilidad microsatélite. Por ejemplo, la sobre-expresión del gen c-myc que con frecuencia encontramos en los TCGs induce inestabilidad cromosómica y extra-cromosómica del locus 12p13, donde se sitúa el gen CCND2, responsable de la expresión de la ciclina D2<sup>119</sup>. Queda aún por establecer la implicación clínica de estos hallazgos moleculares y su relación con la quimio-sensibilidad ó quimio-resistencia de los TCGs.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Los tumores de células germinales en la actualidad tienen una tasa global de curaciones cercana al 95%<sup>1</sup>. El factor fundamental que determina la alta tasa de curaciones de este tipo de neoplasias es su extraordinaria sensibilidad a una gran variedad de agentes quimioterápicos, y en particular al cisplatino. Aún así, a pesar de los grandes logros obtenidos en su tratamiento, entre un 30 y un 50 % de los pacientes de mal pronóstico fallecen por la enfermedad.

Actualmente disponemos de varios de factores con valor pronóstico establecido: las cifras de marcadores tumorales (AFP, B-HGC), el valor de la enzima LDH en suero, la localización del tumor primario y la localización de las metástasis. Estos han permitido definir grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) y facilitar así las decisiones terapéuticas<sup>32</sup>. Aún así sorprende la escasez de estudios sobre poblaciones tumorales resistentes al tratamiento inicial ó recidivantes tras el mismo. Es por tanto de crucial interés la búsqueda de otros marcadores biológicos pronósticos y/o predictivos que ayuden a identificar aquellos tumores que van a tener un curso clínico más tórpido ó que van a desarrollar resistencias a fármacos habitualmente eficaces, y, en definitiva, definir perfiles de quimio-resistencia en estas neoplasias con el fin de optimizar e individualizar el tratamiento de cada paciente.

### **2.1 HIPÓTESIS**

El conocimiento del perfil molecular de los TCGs nos permitirá establecer posibles factores de tipo pronóstico y predictivo, con las consiguientes implicaciones terapéuticas:

1. La expresión tisular de proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis, como p53 y mdm2, puede ser predictiva de resistencia a los tratamientos basados en cisplatino, y convertirse por lo tanto en una herramienta para seleccionar pacientes que probablemente no van a responder a los tratamientos habituales.

2. Las proteínas moduladoras del ciclo celular como las ciclinas D1 y D2 pueden tener un papel en la caracterización más precisa de los TCGs aportando datos que ayuden a establecer el pronóstico y la probable respuesta al tratamiento de un tumor altamente curable.

## 2.2 OBJETIVOS

El propósito de este estudio es la caracterización molecular de una cohorte de pacientes diagnosticados de TCG en estadio avanzado y tratados en diferentes centros españoles, con el fin de establecer un perfil que defina la respuesta al tratamiento quimioterápico y una posible resistencia al cisplatino.

**2.2.1** Describir el patrón de expresión de las proteínas implicadas en el ciclo celular p53, mdm2, ciclina D1 y ciclina D2, analizadas por inmunohistoquímica, en las biopsias de tumores de células germinales de pacientes diagnosticados en distintos hospitales de nuestro país y tratados en el Hospital 12 de Octubre en el periodo tiempo incluido entre 1977-2003.

**2.2.2** Determinar la posible relación de cada uno de los marcadores moleculares estudiados con: la respuesta al tratamiento basado en cisplatino, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de los pacientes.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Con los objetivos enunciados anteriormente se dividió la pauta de trabajo para este estudio en cuatro partes consecutivas en el tiempo e interrelacionadas.

En primer lugar la revisión de las historias clínicas de todos los pacientes diagnosticados de tumor germinal en estadio avanzado, histológicamente documentado, que fueron tratados dentro de un protocolo multidisciplinar en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid en el periodo 1977-2003. Se consideraron TCGs avanzados aquellos tumores estadio IIc ó superior según la clasificación TNM-AJCC. También fueron incluidos en el estudio pacientes con estadios localizados en el momento del diagnóstico que precisaron tratamiento quimioterápico por recidiva tumoral en algún momento de su evolución.

En un segundo tiempo se realizó el análisis inmunohistoquímico de los bloques de parafina correspondientes a todas las biopsias tumorales disponibles. Se determinó la expresión de las proteínas seleccionadas previamente, de forma centralizada, en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

En tercer lugar se procedió al análisis estadístico de los datos recogidos introducidos previamente en un archivo de tipo SPSS<sup>TM</sup> y SAS.

Y por último se trató de establecer la correlación de los resultados analizados con los publicados por otros investigadores y la discusión del impacto de los mismos en la práctica clínica habitual.

## 3.2 RECOGIDA DE DATOS

### 3.2.1 Metodología

La recogida de datos se realizó entre junio de 2003 y junio de 2004 mediante la revisión del registro de tumores germinales generado en nuestro servicio y de las historias clínicas de todos los pacientes con TCG avanzado tratados dentro de un protocolo multidisciplinar en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

### 3.2.2 Variables del estudio

Los datos recogidos, de acuerdo a un protocolo previamente diseñado, se organizaron en las siguientes variables:

1. *Datos de filiación:* nombre y apellidos, teléfono y número de historia clínica.

2. *Fecha del diagnóstico:* Definida como la fecha de la cirugía inicial, ó en su defecto, aquella en la que la evidencia clínica y/o biológica (por la elevación de marcadores tumorales) fue suficiente para el diagnóstico de TCG avanzado.

3. *Edad al diagnóstico.*

4. *Marcadores pre-tratamiento quimioterápico (AFP, LDH, B-HCG):* Las determinaciones de AFP, B-HCG y LDH se llevaron a cabo en el departamento de bioquímica del Hospital Universitario 12 de Octubre. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores superiores a 10ng/ml en el caso de la AFP y a 5UI/ml en el caso de la B-HCG. El límite superior de la normalidad para la LDH se estableció en 230 mg/dl.



5. *Tratamiento quirúrgico de inicio*: si se realizó ó no, fecha, lugar y tipo de cirugía.

6. *Tipo histológico* según la clasificación de la OMS.

7. *Estadío TNM- AJCC*.

8. *Grupo Pronóstico de la IGCCCG*.

9. *Tratamiento Quimioterápico*: si se realizó en un primer momento ó no, fecha de inicio y finalización, esquema y número de ciclos.

10. *Respuesta al tratamiento*:

a) Respuesta Completa (RC).- respuesta completa radiológica, con marcadores tumorales séricos normales.

b) Respuesta Completa Biológica con Masa Residual (RCBCMR).- normalización de marcadores tumorales séricos con persistencia de enfermedad radiológica < 50% de la inicial.

c) Respuesta Parcial (RP): persistencia de < 50% de la enfermedad radiológica inicial y marcadores tumorales séricos elevados.

d) Estabilización de la Enfermedad (EE).- persistencia de > 50% de la enfermedad radiológica inicial y marcadores tumorales séricos elevados.

e) Enfermedad Progresiva (P): progresión radiológica, clínica y/o biológica durante el tratamiento.

f) Respuesta No Evaluable (NE).

11. *Tratamientos de quimioterapia complementarios* a una primera línea: Ningún tratamiento, VIP, TASPE, TASPE x 2, u Otros.

12. *Tratamiento Radioterápico*: si/no, fecha de inicio y finalización, dosis y campos.

13. *Cirugía de la masa residual*: si se realizó ó no, tipo de intervención, e histología de la pieza resecada.

14. *Tratamiento post-cirugía*: si fue necesario ó no y tipo de tratamiento.

15. *Respuesta global al tratamiento inicial*: Definida como la respuesta alcanzada tras el primer intento terapéutico completo, es decir sistémico y local (quimioterapia +/- cirugía ó radioterapia). Se consideraron:

a) Respuesta Completa (RC): pacientes sin evidencia de enfermedad radiológica y marcadores tumorales séricos normales.

b) No evidencia radiológica ó biológica de enfermedad tras la cirugía pero presencia de tumor viable en la pieza resecada (NED + T. viable).

c) No evidencia radiológica ó biológica de enfermedad tras la cirugía pero presencia de fibrosis en la pieza resecada (NED + Fibrosis).

d) No evidencia radiológica ó biológica de enfermedad tras la cirugía pero presencia de teratoma en la pieza resecada (NED + Teratoma).

e) Persistencia de enfermedad a pesar del tratamiento sistémico y local (No NED).

f) Respuesta no evaluable.

Nota: En el análisis estadístico se consideró la respuesta a la quimioterapia como variable dicotómica agrupando la respuesta en RCt (que incluye RC, NED con teratoma y NED con fibrosis) y no RCt (incluyendo en esta última las variables No NED y NED con tumor viable).

16. *Fecha de respuesta total*: Definida como la fecha de fin de tratamiento (3 semanas después del último tratamiento quimioterápico ó radioterápico) ó bien la fecha de la última cirugía de masa residual.

17. *Recaída*: si ó no.

18. *Fecha de recaída y localización*: Fecha de confirmación histológica (PAAF-biopsia), radiológica, ó biológica (elevación tumoral de marcadores) de recaída, y localización de la misma.

19. *Intervalo libre de enfermedad*: Tiempo comprendido entre la fecha de respuesta global al final del tratamiento y la fecha de recaída.

20. *Tratamiento de la recaída*: tipo de tratamiento, fecha de inicio y finalización.

21. *Respuesta al tratamiento de la recaída*: según los mismos criterios que en el apartado 10.

22. *Recurrencia posterior*: sí ó no.

23. *Tratamiento de la recurrencia*: esquema de quimioterapia, radioterapia, ó tipo de cirugía si se llevó a cabo.

24. *Estado en el último seguimiento*: definido como vivo sin enfermedad, vivo con enfermedad, muerto con enfermedad, muerto sin enfermedad, ó perdido.

25. *Fecha de último seguimiento*: Última fecha en la que se ha tenido contacto con el paciente durante el seguimiento. En los fallecidos coincide con la fecha de éxitus.

26. *Causa de éxitus*: tumoral ó no tumoral. Dentro de las causas no tumorales se incluyen las muertes por toxicidad aguda ó crónica, y otras causas no relacionadas con el tratamiento ó el tumor de células germinales.

27. Resultados de los estudios inmunohistoquímicos: se registraron los datos correspondientes a la expresión, evaluada por técnicas de inmunohistoquímica de los siguientes marcadores moleculares:

a) *Proteína p53*: recogida como variable continua (porcentaje de núcleos celulares teñidos por campo), y como variable binaria (tomando como punto de corte una tinción nuclear del 10%).

b) *Mdm2*: recogida como variable continua (porcentaje de núcleos celulares teñidos por campo), como variable cualitativa (tinción leve.-<30%-; tinción

moderada.- entre el 30 y el 60%-; tinción intensa.->60%), y como variable binaria (positiva/negativa), tomando como punto de corte el 40% de células tumorales teñidas, percentil 50 de la muestra.

c) *Ciclina D1*: recogida como variable continua (porcentaje de tinción nuclear), y como variable binaria (positiva/negativa según presencia y ausencia de expresión tisular).

d) *Ciclina D2*: recogida como variable continua (porcentaje de tinción tisular), y como variable binaria (positiva/ negativa) tomando como punto de corte una tinción nuclear del 5%, percentil 50 de la muestra.

### **3.3 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

#### **3.3.1 Recogida de las muestras**

En la localización y recogida de los bloques de parafina correspondientes a las muestras tumorales de los pacientes de estudio participaron activamente los Servicios de Oncología Médica y Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, y se solicitó la colaboración de otros centros (ver anexo de centros colaboradores) en los que algunos pacientes habían sido diagnosticados y/o tratados inicialmente.

#### **3.3.2 Procesamiento y análisis de las muestras**

El procesamiento y análisis de las muestras se realizó de forma centralizada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

El estudio inmunohistoquímico se realizó sobre material fijado en formaldehído al 4% e incluido en parafina con secciones de 3  $\mu\text{m}$  colocadas en portaobjetos xilenados. Se utilizó la técnica peroxidasa-antiperoxidasa como método de inmunodetección, y diaminobenzidina como cromógeno. Para potenciar la recuperación antigénica se empleó una olla a presión, baño o citrato. Para todos los anticuerpos se empleó la técnica de visualización LSAB con el aparato de inmunotinción (“Tech Mate 500”, DAKO, Glostrup, Dinamarca). Los anticuerpos empleados, kit ó clon, casa comercial, dilución, y enzimas se especifican en la siguiente tabla:

**Tabla 5.** Anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico

ANTICUERPO	KIT/ CLON	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	ENZIMA
<b>p53</b>	Clon DO-7	DAKO	1 / 100	No
<b>Mdm-2</b>	Clon SMP14	DAKO	1 / 25	No
<b>Ciclina D1</b>	Clon DCS- 6	DAKO	1 / 100	Prot k 10 min
<b>Ciclina D2</b>	Clon M-20	Santa Cruz Biotechnology California USA	1 / 70	Prot k 10 min

Las muestras fueron revisadas por 3 investigadores diferentes (Dr. Ballestin, Dr. Martinez-Tello, y Dra. García) para confirmar la filiación histológica inicial y seleccionar los cortes más adecuados para el estudio. En los casos en los que se evidenció la presencia de varios subtipos histológicos se realizaron cortes para cada uno de ellos y se individualizó el estudio inmunohistoquímico. Las muestras de teratoma maduro no se incluyeron en el análisis inmunohistoquímico dado que, en tejidos con alto grado de diferenciación y ausencia de mitosis, como es el caso de este tumor, las determinaciones de marcadores moleculares de ciclo celular son siempre negativas.

### 3.3.3 Interpretación de resultados

La expresión de p53 fue evaluada como el porcentaje de núcleos celulares tumorales teñidos sobre el número total de células tumorales en 5 campos de microscopio adyacentes magnificados x 400. Se consideró leve una tinción < 10%, moderada entre el 10 y el 30%, e intensa > del 30%.

En el caso de mdm2 la inmuno-reacción se midió también en porcentaje de células tumorales teñidas, considerando 0% la ausencia de tinción nuclear. Se definió como una tinción de < del 30% como leve, entre el 30-60% moderada y > del 60% muy intensa.

La expresión de ciclina D1 fue registrada como presente (positiva) ó ausente (negativa) en los núcleos celulares, y las muestras puntuadas entre 0 y 100 según el porcentaje de tinción tisular encontrado.

Para la ciclina D2, la tinción fue medida utilizando el mismo método que en la evaluación de la expresión de p53, como porcentaje de células teñidas. Se consideró la variable positiva ó negativa tomando como punto de corte el 5% de tinción tisular.

### **3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos recogidos de las historias clínicas y los resultados del análisis inmunohistoquímico fueron introducidos en dos bases de datos paralelas creadas dentro del programa SPSS TM: una de ellas, la base de datos principal, centrada en los pacientes como unidad de análisis; y una segunda base de datos en la que se consideró como unidad de análisis cada una de las muestras histológicas obtenidas. En esta última se tuvo en cuenta que algunos pacientes (aquellos diagnosticados de tumores mixtos) podían aportar más de una muestra histológica, se consideró cada muestra como unidad y fue empleada exclusivamente como complementaria en el estudio descriptivo de la muestra.

#### **3.4.1 Estadística descriptiva**

Los análisis descriptivos fueron realizados utilizando el programa SAS TM para Windows TM (SAS Institute, Cary, NC). Para describir las características de la muestra se emplearon los siguientes estadísticos: media, mediana, , frecuencias absolutas y frecuencias relativas. Se analizaron por separado las dos bases de datos anteriormente mencionadas. Los resultados se interpretaron considerando cada paciente como unidad, y se complementaron con los resultados del análisis molecular de las diferentes muestras histológicas analizadas.

#### **3.4.2 Estadística analítica**

La estadística analítica se realizó íntegramente sobre la base de datos centrada en cada paciente como unidad de análisis. Previo a los análisis de supervivencia se realizaron una serie cálculos con el objetivo de obtener las variables temporales necesarias para el análisis posterior:

a) Tiempo de seguimiento (TS): el comprendido entre la fecha de diagnóstico de enfermedad avanzada y la fecha de último seguimiento de los pacientes.



b) Tiempo a la progresión (TP): el comprendido entre la fecha de diagnóstico de enfermedad avanzada y la fecha de recidiva ó último seguimiento en el caso de los pacientes no progresados.

c) Tiempo en respuesta (TR): el comprendido entre la fecha de respuesta global de fin de tratamiento y la fecha de recidiva ó último seguimiento en el caso de los pacientes no progresados.

d) Tiempo de supervivencia global (SG): desde la fecha de diagnóstico de enfermedad avanzada a la fecha de último seguimiento.

Se utilizaron tablas de contingencia basadas en el test de Chi-cuadrado para analizar la relación de cada variable molecular con la respuesta al tratamiento basado en cisplatino. La estimación de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad se realizó utilizando el método de Kaplan-Meier. El análisis univariante de supervivencia para la expresión de los distintos marcadores moleculares y para los factores pronósticos clásicos del estudio se realizó mediante el test de log-rank dentro de un modelo de riesgos proporcionales de Cox. El análisis multivariante de supervivencia se realizó con el modelo de regresión de Cox utilizando un proceso de selección anterógrada escalonada (“forward stepwise”). Todos los test estadísticos realizados fueron de dos colas y se definió la significación estadística como un valor de  $p$  igual ó inferior a 0.05.

### **3.5 ASPECTOS ÉTICOS**

El proyecto fue valorado y evaluado positivamente por el comité ético de investigación clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre el 10 de Diciembre de 2003.

El estudio fue financiado por el programa de ayuda a la investigación de la Fundación Mutua Madrileña de Automovilistas, expediente 015/2004.

## **4. RESULTADOS**

## **4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA**

Entre enero de 1977 y enero de 2003, fueron tratados dentro de un protocolo multidisciplinar en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre 245 pacientes diagnosticados de TCG en estadio avanzado. De estos, 84 fueron elegibles para el estudio al ser accesibles para análisis tanto sus datos clínicos como los bloques de parafina correspondientes a las biopsias tumorales. De los 161 restantes: 25 no fueron accesibles para el seguimiento, 5 no fueron biopsiados al diagnóstico, 8 fueron diagnosticados fuera de España (4 en Argentina, 1 en México, 1 en Alemania y 2 en Portugal), en 79 casos no fue posible recuperar las muestras tumorales de diagnóstico inicial, en 10 pacientes el diagnóstico se realizó por citología, y en 34 pacientes se encontró material necrótico ó insuficiente para la inmunohistoquímica en el tumor primario.

De los 84 casos evaluables se analizaron 109 muestras histológicas: 80 archivadas en el Hospital 12 de Octubre (Madrid), 6 procedentes de otros centros de la Comunidad de Madrid (1 Hospital Severo Ochoa; 5 Alcalá de Henares), y 23 de otros centros de España (ver anexo de centros colaboradores).

### **4.1.1 Características de los pacientes**

Las características de los pacientes están resumidas en la (Tabla 6). La edad media al diagnóstico fue de 29 años, con una mediana de 27 años (16-63). Todos ellos eran de raza caucásica y nacionalidad española, excepto dos pacientes de nacionalidad argentina. Setentaidos de los 84 pacientes presentaron tumor testicular al diagnóstico y fueron tratados con orquiectomía inguinal. En los 12 restantes el diagnóstico histológico se obtuvo mediante biopsia (8 de localización primaria mediastínica, 2 retroperitoneal, 1 intracraneal y 1 de origen desconocido diagnosticado con biopsia de un ganglio linfático supraclavicular). La cirugía inicial y/o diagnóstico histológico fue realizada en el Hospital Universitario 12 de Octubre en 35 de los 84 casos, en 15 pacientes se realizó en otros hospitales de la Comunidad de Madrid, y otros 34 fueron remitidos desde otros centros hospitalarios de España tras el diagnóstico (ver anexo de centros colaboradores).

Respecto al tipo tumoral, 19 de los 84 pacientes fueron diagnosticados de tumor germinal tipo seminoma clásico, y 65 de tumor germinal no seminomatoso; de estos últimos 34 presentaban una única histología (28 carcinoma embrionario, 4 coriocarcinoma y 2 tumor del seno endodérmico), y el resto fueron tumores mixtos.

Al diagnóstico 74 pacientes (80%) presentaban estadio avanzado ( $\geq$  IIc según la clasificación TNM-AJCC), y 10 pacientes (20%) estadio inicial (2 estadio Is, 2 estadio IIa, 6 estadio IIb). Estos últimos fueron posteriormente considerados refractarios por su evolución clínica. Cabe destacar que 43 pacientes (51%) no presentaban metástasis al diagnóstico (M0), y de los 41 restantes tan solo 8 (9.5%) fueron diagnosticados con metástasis viscerales no pulmonares (M1b).

Antes del inicio del tratamiento quimioterápico con cisplatino presentaban una elevación de los valores séricos de AFP, B-HCG y LDH sobre el límite superior de la normalidad 42 pacientes (50%), 47 pacientes (56%) y 39 pacientes (46%) respectivamente. En 11 de los 84 pacientes (13%) los valores séricos de AFP y B-HCG no se encontraron reflejados en las historias clínicas, y el valor de la LDH pre-tratamiento no estaba reflejado en 24 de los casos (30%). El valor medio de AFP sérica fue de 1566 ng/ml, con una mediana de 26 ng/ml, (0-28560). La media de los valores de B-HCG registrados fue 3895 UI/ml, con una mediana de 14 UI/ml, (0-143980). Y para la LDH la media fue de 609 mg/dl, y la mediana 352, (88-7912).

**Tabla 6(a).** Características clínicas de los pacientes

<b>Características</b>	<b>Pacientes (N=84)</b>
Edad (Mediana; años)	27 (16-63)
Localización	
Testicular	72 (85%)
Retroperitoneal	2 (2.5%)
Mediastínica	8 (9.5%)
SNC	1 (1.2%)
O.desconocido	1 (1.2%)
Cirugía inicial	
Orquiectomía	72 (85%)
Biopsia	12 (15%)
Lugar cirugía diagnóstica	
Hospital 12 de Octubre	35 (41.6%)
H. Comunidad Madrid	15 (18%)
Otros centros (España)	34 (40.4%)
Histología tumoral	
Seminoma	19 (22.6%)
No seminoma	
Puro	34 (40.4%)
Mixto	31 (37%)
Metástasis al diagnóstico	
M0	43 (51.3%)
M1a	33 (39.2%)
M1b	8 (9.5%)
Estadio TNM-AJCC	
Is	2 (2.4%)
II	9 (10.7%)
IIa	2 (2.4%)
IIb	6 (7.1%)
IIc	7 (8.3%)
III	11 (13.1%)
IIIa	10 (11.9%)
IIIb	19 (22.7%)
IIIc	18 (21.4%)
Riesgo IGCCCG	
Bajo	29 (34.5%)
Intermedio	24 (28.6%)
Alto	17 (20.2%)
Desconocido	14 (16.7%)

Otros marcadores pronósticos clásicos evaluados fueron la invasión vascular y/o linfática en la pieza quirúrgica. Tan solo se encontraron en 21 (25%) y 18 (21%) de los 84 tumores evaluados, respectivamente.

La clasificación pronóstica diseñada por el IGCCCG solo pudo ser aplicada en 70 pacientes (83.3%) dada la ausencia de alguno de los marcadores tumorales séricos en 14 pacientes. Aún así, 29 pacientes (34.5%) presentaban al diagnóstico tumores germinales de bajo riesgo, 24 pacientes (28.5%) tumores de riesgo intermedio, y 17 pacientes (20.2%) fueron clasificados como de alto riesgo al diagnóstico.

De los 84 pacientes, 2 recibieron tratamiento quimioterápico previo a la primera línea de tratamiento con cisplatino para enfermedad avanzada: uno de ellos recibió una quimioterapia sin cisplatino, y el otro paciente recibió tratamiento adyuvante con carboplatino tras la cirugía inicial. Entre los esquemas de quimioterapia como primera línea para enfermedad avanzada que recibieron las pacientes destaca como mayoritario el esquema BEP en 54 pacientes (64.3%). Veinte pacientes fueron tratados en primera línea según el esquema PVB (23.8%), 6 pacientes (7.1%) recibieron EP, 1 paciente VIP con bleomicina, 1 paciente PVB con doxorubicina, y 2 pacientes fueron tratados con esquemas de poli-quimioterapia con cisplatino no especificados. Los pacientes recibieron en primera línea una mediana de 4 ciclos de quimioterapia, (1-10).

**Tabla 6(b).** Características de los pacientes: Tratamientos.

<b>Características</b>	<b>Pacientes (N=84)</b>
Tratamiento QT previo	
No	82 (97%)
Si	2 (3%)
Tratamiento QT primera línea	
BEP	54 (64.3%)
PVB	20 (23.8%)
PVBA	1 (1.2%)
EP	6 (7.1%)
VIP-Bleomicina	1 (1.2%)
Poliqt con CDDP	2 (2.4%)
Número de ciclos (mediana)	4 ( 1-10)
Respuesta a QT primera línea	
RC	31 (36.9%)
RCBCMR	30 (35.7%)
RP	14 (16.7%)
EE	2 (2.4%)
P	5 (5.9%)
No evaluable	2 (2.4%)
QT complementaria	
No	62 (73.8%)
Si	
VIP	11 (13.1%)
TASPE	2 (2.4%)
TASPE x 2	1 (1.2%)
Otros (dosis estándar)	8 (9.5%)
Cirugía de masa residual	
No	48 (57.1%)
Si	
Linfadenectomía	21 (25%)
Toracotomía	12 (14.3%)
LRP + toracotomía	2 (2.4%)
Otros	1 (1.2%)
Histología de la masa residual	*(N=36)
Fibrosis ó necrosis	15 (41.7%)
Teratoma maduro	12 (33.3%)
Tumor viable	9 (25%)
Respuesta Global	
Respuesta completa (RCt)	62 (73.8%)
No respuesta completa (RCt)	22 (26.2%)

\* Pacientes a los que se les realizó cirugía de masa residual.



La respuesta al tratamiento quimioterápico con cisplatino de primera línea para enfermedad avanzada no pudo ser evaluada en dos pacientes por éxitus durante el tratamiento: en un caso debido a trombo-embolismo pulmonar masivo, y en el segundo caso por sangrado de metástasis intracraneales. De los 82 pacientes restantes 31 (36.9%) alcanzaron una respuesta completa (RC), 30 (35.7%) una respuesta completa con masa residual (RCBCMR), 14 una respuesta parcial (RP), 2 pacientes enfermedad estable (EE) y en 5 pacientes la enfermedad progresó durante el tratamiento. Veintidós pacientes requirieron tratamiento quimioterápico complementario de primera línea: 11 fueron tratados con VIP, 8 recibieron otros esquemas de quimioterapia a dosis estándar, 2 fueron sometidos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE), y un paciente fue tratado con un doble trasplante en tandem (TASPE x 2).

Se realizó cirugía de las masas residuales en 36 de los casos (42.9%): 21 pacientes (25%) requirieron linfadenectomía retroperitoneal, 12 (14.3%) toracotomía, y 2 pacientes fueron sometidos a ambas intervenciones de forma consecutiva. En el 14.3% de los casos (12 pacientes) la histología de la masa residual evidenció teratoma maduro, en 15 pacientes (17.9%) necrosis y/o fibrosis, y en 9 casos (10.7%) se encontró tumor viable en la pieza quirúrgica. De estos últimos, 7 recibieron quimioterapia postquirúrgica a dosis estándar y uno de ellos fue sometido a trasplante autólogo de células hematopoyéticas. Tan solo un paciente, con tumor germinal primario de localización mediastínica y masa “bulky” inicial, considerado irresecable tras la primera línea de tratamiento con quimioterapia recibió tratamiento complementario con radioterapia.

Como respuesta global al tratamiento inicial (RCt), 62 de los 84 pacientes (73.8%) quedaron libres de enfermedad. De ellos, 35 (el 41.7% del total de pacientes) lograron una respuesta completa solo con el tratamiento quimioterápico, y en los otros 26 se alcanzó la respuesta completa tras cirugía de la masa residual. Siete pacientes requirieron quimioterapia de consolidación tras la cirugía por evidenciarse tumor viable en la masa residual, y 16 pacientes (19.1%) presentaron persistencia de enfermedad neoplásica al final del primer tratamiento multidisciplinar completo (quimioterapia y cirugía).

Durante la evolución, con una mediana de seguimiento de 10 años, ( 2-25), 24 pacientes (28%) fueron considerados refractarios: 16 por persistencia de enfermedad tras el primer intento terapéutico completo (tratamiento quimioterápico con cisplatino +/- tratamiento quimioterápico complementario +/- cirugía de masa residual ó radioterapia), y 8 por recaída tras haber alcanzado respuesta completa. La localización más frecuente de recaída fue el retroperitoneo (45.8%), seguida del pulmón (20.8%) y del mediastino (20.8%). La progresión tumoral tuvo lugar en un intervalo de tiempo menor de 2 años desde el final del tratamiento en 18 de los casos. De los 24 pacientes refractarios, 14 fueron clasificados como de mal pronóstico según los criterios definidos por el grupo de Fossa y cols<sup>67</sup>.

En el tratamiento de las recidivas se emplearon distintos esquemas de quimioterapia (VIP, TIP y TASPE como combinaciones más frecuentes), seguido de cirugía ó radioterapia en los casos en que fue preciso. En 9 pacientes se alcanzó una respuesta completa, 3 presentaron RCBCMR, 4 presentaron una respuesta parcial, 2 enfermedad estable y 5 enfermedad progresiva. Veinte de los 24 pacientes refractarios (83.3%) presentaron recaídas posteriores.

**Tabla 6(c).** Características de los pacientes refractarios a quimioterapia basada en cisplatino.

Características	Pacientes (N=24)
Tumores refractarios	
Persistencia	16 (66.6%)
Recaída	8 (33.3%)
Lugar de progresión	
Retroperitoneo	10 (45.8%)
Pulmón	5 (20.8%)
Mediastino	5 (20.8%)
Hígado	1 (4.2%)
Retrop.+Pulmón	2 (8.4%)
Solo marcador	1 (4.2%)
Intervalo libre de progresión	
> 2 años	6 (25.0%)
≤ 2 años	18 (75.0%)
Grupo pronóstico (Fossa y cols.)	
Buen pronóstico	10 (41.6%)
Mal pronóstico	14 (59.3%)
Tratamiento progresión	
VIP	6 (25.0%)
TIP	5 (20.8%)
TASPE	3 (12.5%)
Otros (dosis estándar)	8 (33.3%)
Cirugía (sin QT)	2 (8.4%)
Rspuesta tratamiento progresión	
RC	9 (37.5%)
RCBCMR	3 (12.5%)
RP	4 (16.6%)
EE	2 (8.4%)
P	6 (25.0%)
Recaídas posteriores	
No	4 (16.6%)
Si	20 (83.3%)

Con una mediana de seguimiento de 10 años (1.8 - 25 años), en el momento del análisis 60 pacientes (71.5%) estaban vivos, 56 (66.7%) sin evidencia de enfermedad y 4 (4.8%) con TCG en tratamiento. Veinticuatro pacientes (28.5%) fallecieron durante el seguimiento: 20 (23.7%) con tumor activo, de los cuales 19 fallecieron por progresión de la enfermedad y uno de ellos por una complicación intercurrente (trombo-embolismo pulmonar severo durante el tratamiento). En 4 pacientes libres de enfermedad (4.8%) la causa de éxitus no estuvo relacionada con su tumor germinal avanzado (2 sépsis durante el tratamiento quimioterápico de consolidación tras respuesta completa, 1 melanoma metastásico y 1 adenocarcinoma de colon metastásico).

**Tabla 6(d).** Características de los pacientes: fin de seguimiento

Características	Pacientes (N=84)
Tiempo de seguimiento (mediana; años)	10.65 (1.8-25)
Estado a último seguimiento	
VCE	4 (4.8%)
VSE	56 (66.7%)
MCE	20 (23.7%)
MSE	4 (4.8%)
Causa de éxitus	*(N = 24)
TCG	19 (79.1%)
No TCG	5 (20.8%)

\* Número de pacientes fallecidos.

#### 4.1.2 Características de las muestras histológicas

De los pacientes incluidos en el estudio, 21 aportaron más de una muestra histológica (18 pacientes 2 muestras, 2 pacientes 3 muestras y 1 paciente 4 muestras). Además, 16 muestras se obtuvieron de tumores mixtos en los que se analizaron las diferentes histologías por separado, 3 de metástasis, y 4 de resecciones de masa residual. En total se analizaron 109 bloques de parafina de biopsias tumorales de los 84 pacientes del estudio (Tabla 7).

En 83 bloques se encontró una única histología. El carcinoma embrionario fue el tipo histológico más frecuente, encontrado como principal en 50 muestras (45.8%), y como histología secundaria en otras 16. En segundo lugar de frecuencia encontramos el seminoma clásico, como principal en 29 muestras (26.6%) y secundario en otras 4. Además se encontraron tumores germinales tipo teratoma inmaduro y tumor del seno endodérmico (8 muestras de cada uno de ellos), 7 coriocarcinomas, 4 teratocarcinomas y 3 seminomas atípicos. Por último en 17 muestras se demostró presencia de teratoma maduro como histología secundaria.

**Tabla 7.** Características de las muestras histológicas

Características	Muestras (N=109)
Tipo histológico principal	
Seminoma clásico	29 (26.6%)
Carcinoma embrionario	50 (45.9%)
Coriocarcinoma	7 (6.4%)
Teratocarcinoma	4 (3.7%)
T. seno endodérmico	8 (7.3%)
Teratoma inmaduro	8 (7.3%)
Seminoma atípico	3 (2.8%)
Histologías secundarias	
Ninguna	83 (76.1%)
Seminoma (típico + atípico)	7 (6.4%)
Coriocarcinoma	2 (2.1%)
Carcinoma embrionario	11 (10.1%)
T.seno endodérmico	6 (5.6%)
Teratoma	17 (15.5%)

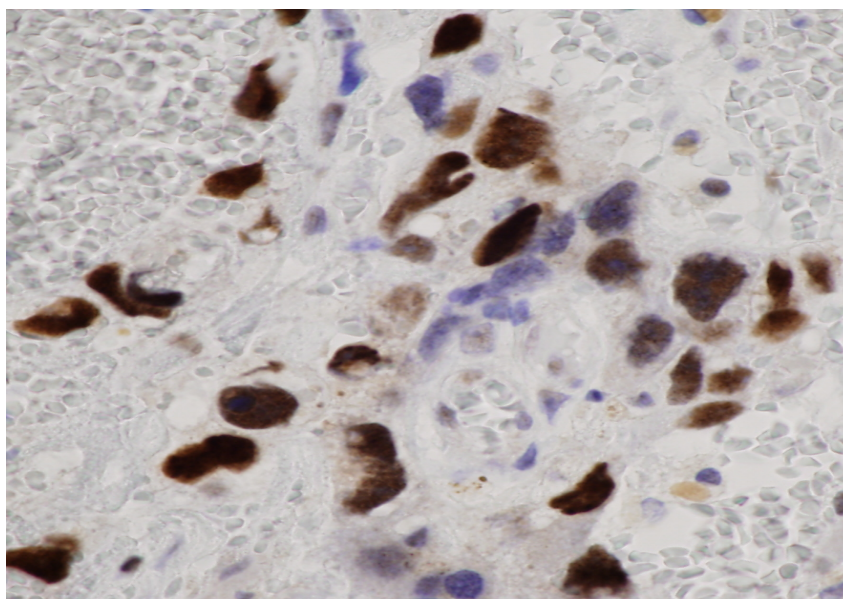
## 4.2 EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES

La expresión inmunohistoquímica de los marcadores tumorales se analizó de forma separada para cada uno de los componentes de las muestras histológicas. En los tumores mixtos se tomó como referencia el análisis del tipo histológico principal, ó en su defecto el de características más agresivas.

### 4.2.1 Expresión de p53

La expresión inmunohistoquímica de p53 fue analizada en las 109 muestras histológicas. Fig. 5. El porcentaje de expresión tisular medio fue de 16.5%, con una mediana del 10% (0-90) (Tabla 8a). Se objetivó ausencia completa de expresión de p53 en 21 muestras (19.3%). En 53 muestras (48.6%) la expresión de p53 no superó el 10% de núcleos celulares teñidos, y 18 de las muestras (16.5%) presentaron expresión tisular por encima del 30% para p53 (Tabla 8b).

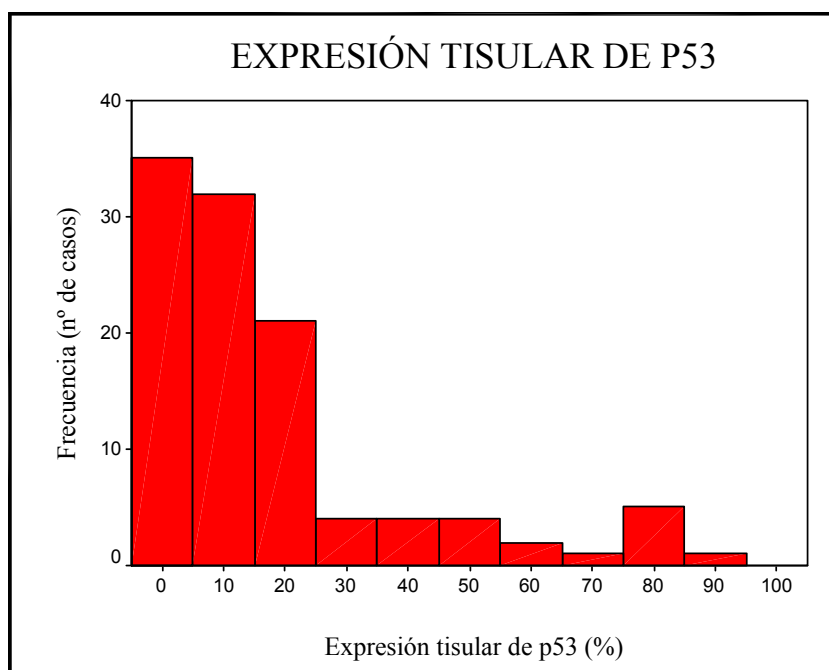
**Fig. 6. Imagen correspondiente a un coriocarcinoma con tinción positiva intensa para p53 [paciente n° 21]**



**Tabla 8a.** Expresión tisular de p53 (%)

<b>N</b>	<b>109</b>
Media	16,58
Mediana	10,00
Rango	90
Mínimo	0
Máximo	90
Percentiles	25
	50
	75
	2,00
	10,00
	20,00

**Fig. 5.** Expresión tisular de p53



En el análisis por subtipos histológicos destaca que todas las muestras de seminoma clásico (29 muestras, 26.6% del total) presentaron expresión de p53 pero en la mayoría (19 muestras, un 65.5% de los mismos) la expresión fue leve (<10%). De igual forma, todos los coriocarcinomas fueron positivos para p53, pero con expresión moderada ó intensa. De las 50 muestras de carcinoma embrionario analizadas 21 (42% de los mismos) presentaron <10% de expresión de p53.

**Tabla 8b.** Expresión de p53.

Tinción	P53		
	< 10%	10 - 30%	> 30%
<b>Muestra (n = 109)</b>	53 (48,6%)	38 (34,9%)	18 (16,5%)
<b>Seminoma (n=32)</b>	21 (65,6%)	11 (34,4%)	0 (0%)
<b>Clásico (n = 29)</b>	19 (65,5%)	10 (34,5%)	0 (0%)
<b>Atípico (n = 3)</b>	2 (66,6%)	1 (33,3%)	0 (0%)
<b>TCGNS (n=77)</b>	32 (41,6%)	27 (35%)	18 (23,4%)
<b>Ca. embrionario (n = 50)</b>	21 (42%)	19 (38%)	10 (20%)
<b>T. del seno endodérmico (n = 8)</b>	4 (50%)	2 (25%)	2 (25%)
<b>Teratoma inmaduro (n = 8)</b>	6 (75%)	2 (25%)	0 (0%)
<b>Coriocarcinoma (n = 7)</b>	0 (0%)	3 (42,8%)	4 (57,2%)
<b>Teratocarcinoma (n = 4)</b>	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)



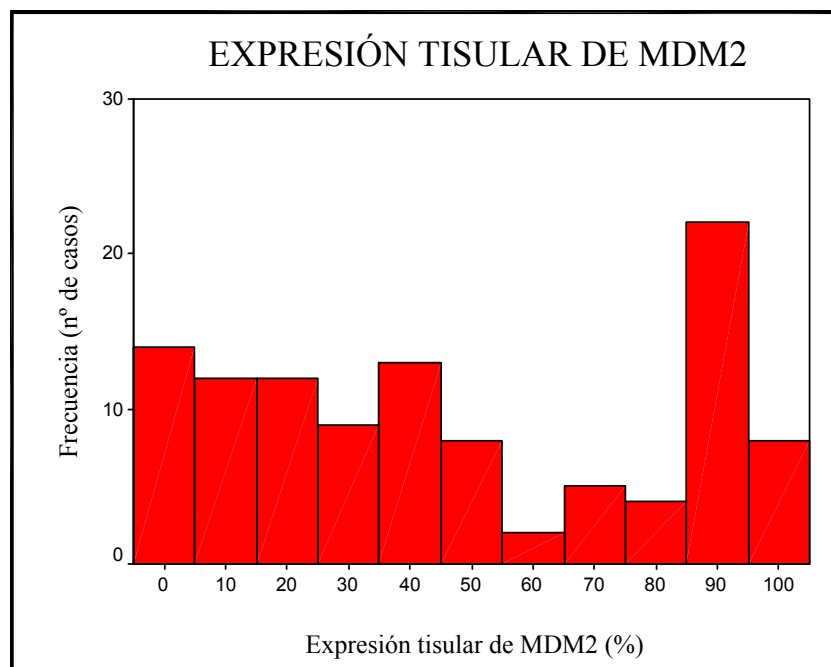
#### 4.2.2 Mdm2

Un 90% de las muestras (n = 98) presentaron expresión tisular de la proteína mdm2 con mayor ó menor intensidad (Tabla 9a y Fig. 7).

**Tabla 9a.** Expresión tisular de mdm2 (%)

<b>N</b>	<b>109</b>
Media	45,82
Mediana	40,00
Rango	97
Mínimo	0
Máximo	97
Percentiles	
25	15,00
50	40,00
75	85,00

**Fig. 7.** Expresión tisular de MDM2

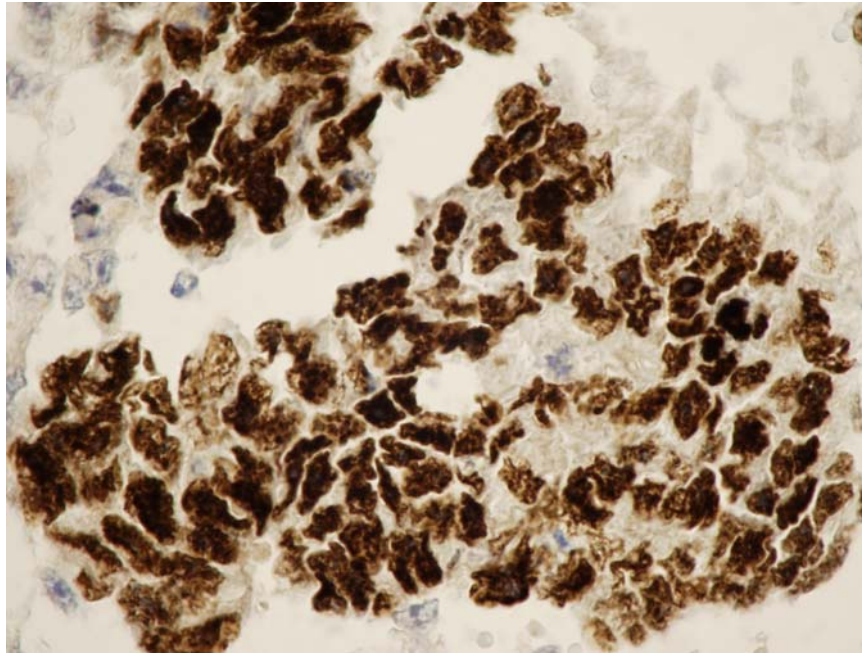


En 11 muestras (10%) no se detectó expresión de dicha proteína. En el 60% de los casos (66 muestras) la tinción superó el 30% de los núcleos celulares, y en 41 muestras (37%) fue mayor del 60%. La mayoría de los seminomas clásicos (26 casos, un 89.7% de los mismos) presentaron tinción baja ó moderada para mdm2, a diferencia de las 4 muestras de teratocarcinoma que presentaron una tinción intensa (> 60% de núcleos celulares teñidos) (Tabla 9b).

**Tabla 9b.** Expresión de Mdm2.

Tinción	Mdm2		
	< 30%	30 - 60%	> 60%
<b>Muestra (n = 109)</b>	39 (35.7%)	29 (26.6%)	41 (37.6%)
<b>Seminoma (n=32)</b>	19 (59.4%)	10 (31.2%)	3 (9.4%)
<b>Clásico (n = 29)</b>	17 (58.6%)	9 (31.1%)	3 (10.3%)
<b>Atípico (n = 3)</b>	2 (66.6%)	1 (33.3%)	0 (0%)
<b>TCGNS (n=77)</b>	20 (26%)	19 (24.6%)	38 (49.4%)
<b>Ca. embrionario (n = 50)</b>	13 (26%)	11 (22%)	26 (52%)
<b>T. del seno endodérmico (n = 8)</b>	2 (25%)	2 (25%)	4 (50%)
<b>Teratoma inmaduro (n = 8)</b>	4 (50%)	3 (37%)	1 (12.5%)
<b>Coriocarcinoma (n = 7)</b>	1 (14.2%)	3 (42.9%)	3 (42.9%)
<b>Teratocarcinoma (n = 4)</b>	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)

**4. Fig. 8. Imagen correspondiente al corte de un teratocarcinoma con tinción positiva intensa para mdm2 [paciente n° 32]**



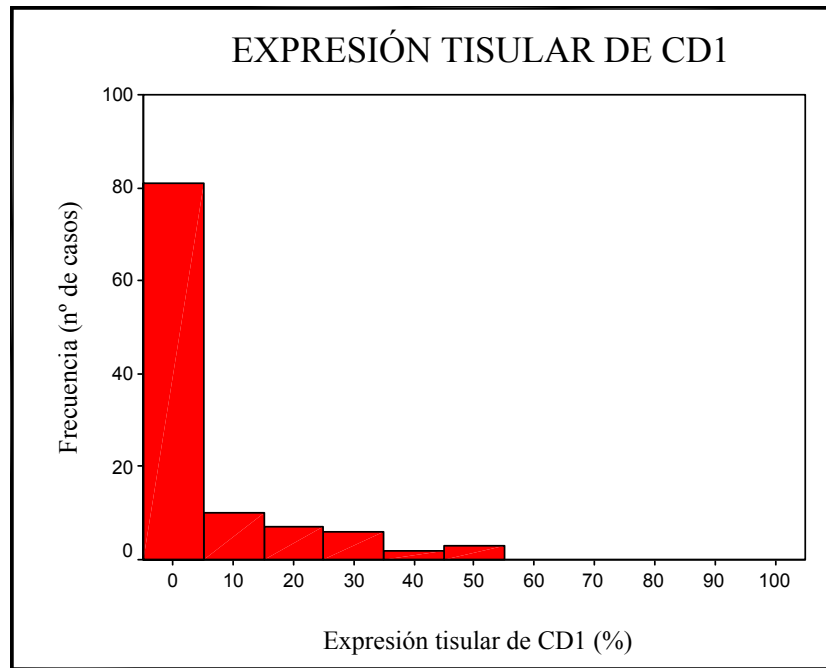
### 2.3 Ciclina D1

El análisis inmunohistoquímico de las 109 muestras demostró ausencia de expresión de ciclina D1 en 73 (66.9% de los casos). Fig. 9. En las 36 restantes (33.1%) la tinción nuclear media fue del 5.65% (0-48) (Tabla 10a).

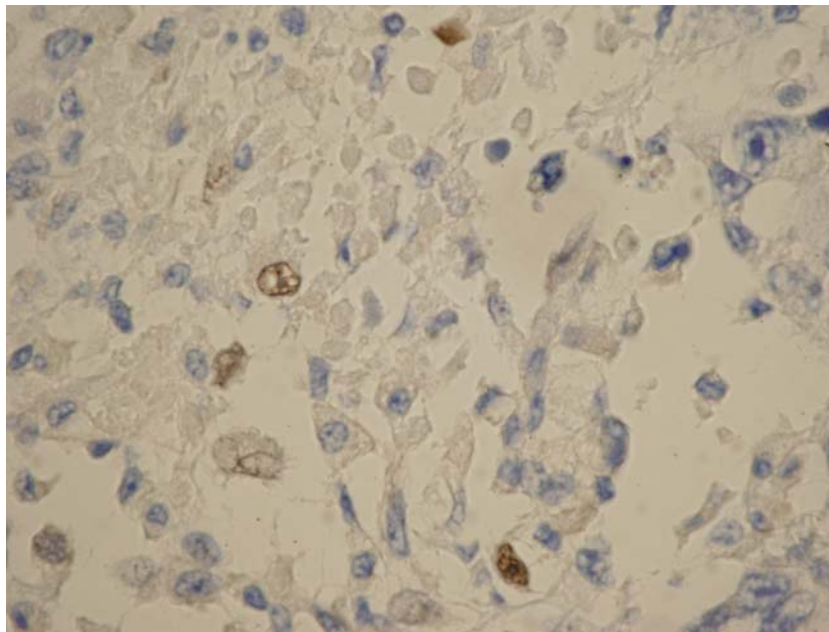
**Tabla 10a.** Expresión tisular de Ciclina D1 (%)

<b>N</b>		<b>109</b>
Media		5,63
Mediana		0,00
Rango		48
Mínimo		0
Máximo		48
Percentiles	25	0,00
	50	0,00
	75	5,00

**Fig. 9. Expresión tisular de CD1**



**Fig. 10. Imagen correspondiente al corte de un teratocarcinoma con tinción positiva leve para CD1 [paciente n° 32]**



El 79.3% de los seminomas clásicos (23 muestras) resultó negativo para ciclina D1, así como el 100% de los seminomas atípicos (n = 3) y de los coriocarcinomas (7 muestras). Solo se encontró ausencia de expresión de ciclina D1 en 1 de los 4 teratocarcinomas de la muestra (25%) (Tabla 10b).

**Tabla 10b.** Expresión de Ciclina D1

Tinción	Ciclina D1	
	Negativa (0%)	Positiva (>0%)
<b>Muestra</b> (n = 109)	73 (66.9%)	36 (33.1%)
<b>Seminoma</b> (n=32)	26 (81.2%)	6 (18.8%)
<b>Clásico</b> (n = 29)	23 (79.3%)	6 (20.7%)
<b>Atípico</b> (n = 3)	3 (100%)	0 (0%)
<b>TCGNS</b> (n=77)	47 ( 61%)	30 (39%)
<b>Ca. embrionario</b> (n = 50)	32 (64%)	18 (36%)
<b>T. del seno endodérmico</b> (n = 8)	3 (37.5%)	5 (62.5%)
<b>Teratoma inmaduro</b> (n = 8)	4 (50%)	4 (50%)
<b>Coriocarcinoma</b> (n = 7)	7 (100%)	0 (0%)
<b>Teratocarcinoma</b> (n = 4)	1 (25%)	3 (75%)

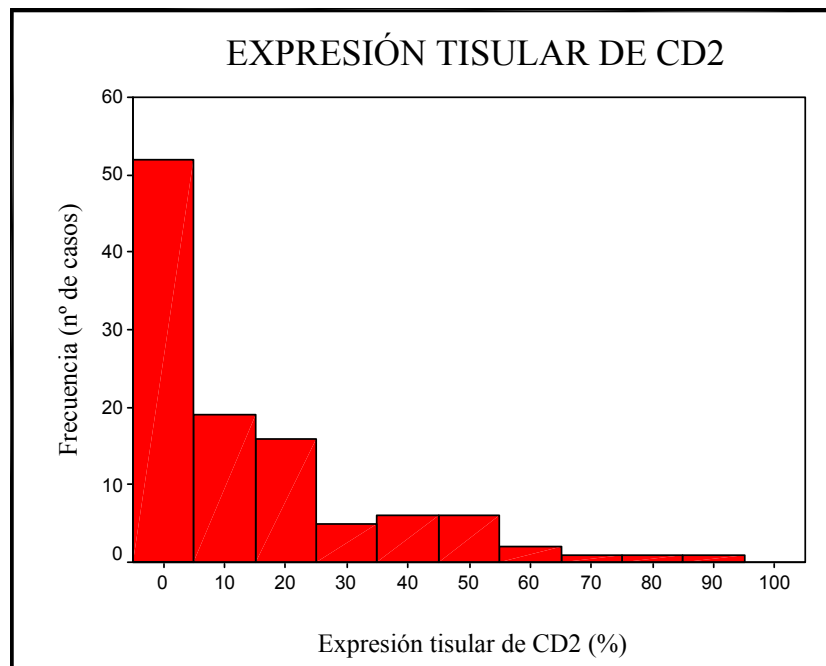
#### 4.2.4 Ciclina D2

El análisis de expresión tisular de ciclina D2 fue positivo en 66 de las 109 muestras analizadas (60.6%), con una tinción citoplasmática media del 13.5%, (0-90) (Tabla 11a). Fig. 11.

**Tabla 11a.** Expresión tisular de Ciclina D2 (%)

<b>N</b>	<b>109</b>	
Media	13,52	
Mediana	5,00	
Rango	90	
Mínimo	0	
Máximo	90	
Percentiles	25	0,00
	50	5,00
	75	20,00

**Fig. 11.** Expresión tisular de CD2

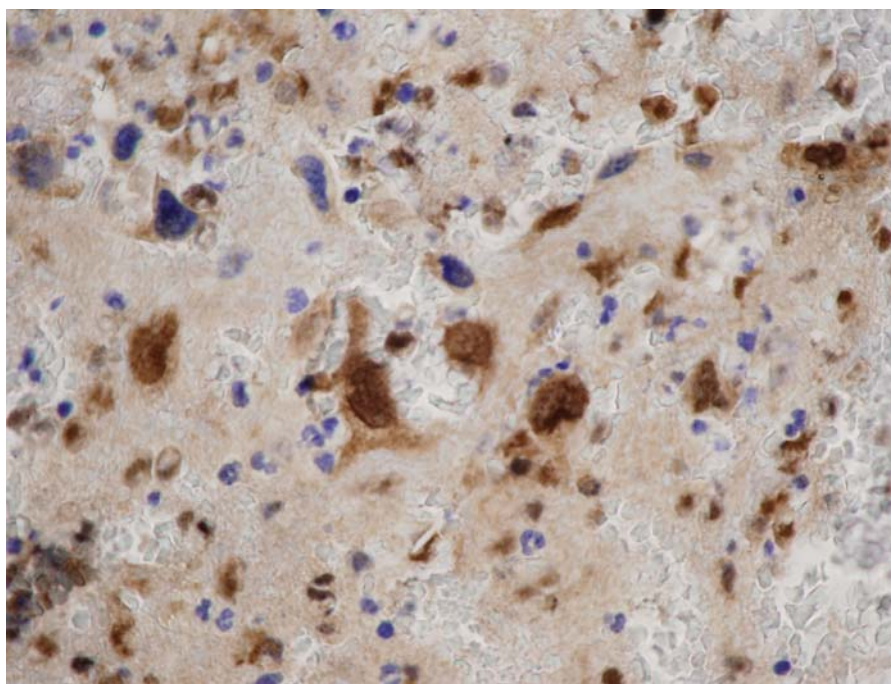


Entre los seminomas clásicos 17 muestras (58.6%) presentaron un porcentaje de tinción citoplasmática menor del 5%, así como los 4 teratocarcinomas (100%) y el 100% (n = 3) de los seminomas atípicos. De los 50 carcinomas embrionarios 25 (50%) también resultaron negativos (Tabla 11b).

**Tabla 11b.** Expresión de Ciclina D2

Tinción	Ciclina D2	
	Negativa (<5%)	Positiva (≥5%)
<b>Muestra</b> (n = 109)	52 (47.7%)	57 (52.3%)
<b>Seminoma</b> (n=32)	17 (53.1%)	15 (46.9%)
<b>Clásico</b> (n = 29)	17 (58.6%)	12 (41.3%)
<b>Atípico</b> (n = 3)	0 (0%)	3 (100%)
<b>TCGNS</b> (n=77)	40 (51.9%)	37 (48.1 %)
<b>Ca. embrionario</b> (n = 50)	25 (50%)	25 (50%)
<b>T. del seno endodérmico</b> (n = 8)	3 (37.5%)	5 (62.5%)
<b>Teratoma inmaduro</b> (n = 8)	4 50%)	4 (50%)
<b>Coriocarcinoma</b> (n = 7)	4 (57.1%)	3 (42.9%)
<b>Teratocarcinoma</b> (n = 4)	4 (100%)	0 (0%)

**Fig. 12. Imagen correspondiente al corte de un coriocarcinoma con tinción positiva intensa para CD2 [paciente n° 21]**





**Tabla 12.** Perfil de expresión tisular de los marcadores moleculares según la histología de la muestra

	P53		Mdm2		CD1		CD2	
Tinción	<10%	≥10%	<60%	≥60%	negativa	positiva	<10%	≥10%
<b>Muestra (n=109)</b>	53 (48.5%)	56 (51.5%)	68 (62.3%)	41 (37.6%)	73 (66.9%)	36 (33.1%)	64 (58.7%)	45 (41.3%)
<b>Seminoma (n=32)</b>	21 (65.6%)	11 (34.3%)	29 (90.6%)	3 (9.4%)	26 (81.2%)	6 (18.8%)	19 (59.4%)	13 (40.6%)
<b>Clásico (n=29)</b>	19 (65.5%)	10 (34.5%)	26 (89.7%)	3 (10.3%)	23 (79.3%)	6 (20.7%)	17 (58.6%)	12 (41.4%)
<b>Atípico (n=3)</b>	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)
<b>TCGNS (n=77)</b>	32 (41.6%)	55 (71.4%)	39 (50.6%)	38 (49.4%)	47 (61.1%)	30 (38.9%)	45 (58.4%)	32 (41.6%)
<b>Coriocarcinoma (n=7)</b>	0 (0%)	7 (100%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	7 (100%)	0 (0%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)
<b>Teratocarcinoma (n=4)</b>	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)	0 (0%)
<b>T. del seno endodérmico (n=8)</b>	4 (50%)	4 (50%)	4 (50%)	4 (50%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)
<b>Teratoma inmaduro (n=8)</b>	6 (75%)	2 (25%)	7 (87.5%)	1 (12.5%)	4 (50%)	4 (50%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)
<b>Ca. embrionario (n=50)</b>	21(42%)	29(58%)	24 (48%)	26 (52%)	32 (64%)	18 (36%)	27 (54%)	23 (46%)

### 4.3 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

El segundo objetivo del estudio es determinar la posible relación de cada uno de los marcadores moleculares estudiados con la respuesta al tratamiento basado en cisplatino, es decir su valor como factores predictivos de respuesta. No obstante también hemos evaluado la influencia de otros factores pronósticos clásicos. Las variables analizadas, en análisis univariante, fueron las siguientes: histología de seminoma clásico, presencia de carcinoma embrionario y presencia de tumor del seno endodérmico (como subgrupos histológicos más numerosos), localización del tumor primario, AFP elevada por encima del límite superior normal, BHCG elevada por encima del límite superior normal, LDH elevada por encima del límite superior normal, presencia de metástasis viscerales no pulmonares en el momento del diagnóstico, riesgo según la clasificación del IGCCCG, y la expresión de los marcadores moleculares analizados (p53, mdm2, ciclina D1 y ciclina D2). Para el análisis estadístico los pacientes con marcadores séricos (AFP, BHCG y/o LDH) desconocidos fueron incluidos en el grupo de pacientes con valores dentro de la normalidad ya que epidemiológicamente es lo más frecuente

#### 4.3.1 Valor de los factores pronósticos clásicos como predictivos de la respuesta al tratamiento

##### 4.3.1.1 Presencia de seminoma (como histología primaria ó secundaria)

Seminoma	Nº pacientes	RC	p
No	56	39 (69.6%)	0.21
Si	28	23 (82.1%)	

**4.3.1.2 Presencia de carcinoma embrionario (como histología primaria ó secundaria)**

<b>Carcinoma embrionario</b>	<b>Nº pacientes</b>	<b>RC</b>	<b>p</b>
<b>No</b>	31	22(70.9%)	<i>0.79</i>
<b>Si</b>	53	40 (75.4%)	

**4.3.1.3 Presencia de tumor del seno endodérmico (como histología primaria ó secundaria)**

<b>T. seno endodérmico</b>	<b>Nº pacientes</b>	<b>RC</b>	<b>p</b>
<b>No</b>	73	57 (78%)	<i>0.022</i>
<b>Si</b>	11	5 (45.4%)	

**4.3.1.4 Localización del tumor primario**

<b>Localización</b>	<b>Nº pacientes</b>	<b>RC</b>	<b>p</b>
<b>Mediastínica</b>	8	3 (37.5%)	<i>0.014</i>
<b>No mediastínica</b>	76	59 (77.6%)	

**4.3.1.5 Presencia de metástasis viscerales no pulmonares al diagnóstico**

<b>M</b>	<b>Nº pacientes</b>	<b>RC</b>	<b>p</b>
<b>M0 ó M1a</b>	76	59 (77.6%)	<i>0.014</i>
<b>M1b (no pulmonares)</b>	8	3 (37.5%)	

**4.3.1.6 AFP elevada por encima del límite superior normal al diagnóstico**

AFP	Nº pacientes	RC	p
> 10 ng/ml	42	27 (64.3%)	0.031
≤ 10 ng/ml	42	35 (83.3%)	

**4.3.1.7 BHCG elevada por encima del límite superior normal al diagnóstico**

BHCG	Nº pacientes	RC	p
> 5 UI/ml	47	31 (65.9%)	0.035
≤ 5 UI/ml	37	31 (83.7%)	

**4.3.1.8 LDH elevada por encima del límite superior normal al diagnóstico**

LDH	Nº pacientes	RC	p
> 230 mg/ml	39	28 (71.8%)	0.69
≤ 230 mg/ml	45	34 (75.6%)	

**4.3.1.9 Riesgo según la clasificación pronóstica del IGCCCG**

Riesgo	Nº pacientes	RC	p
Bajo	29	25 (86.2%)	0.002
Intermedio	24	20 (83.3%)	
Alto	17	7 (41.2%)	

#### 4.3.2 Valor de los marcadores moleculares estudiados como predictivos de la respuesta al tratamiento

##### 4.3.2.1 Expresión de p53 (porcentaje de núcleos celulares teñidos en inmunohistoquímica)

Para el análisis estadístico se consideró la variable como positiva ó negativa tomando como punto de corte el 10% de tinción nuclear, punto que se corresponde con el percentil 50 de la muestra.

p53	Nº pacientes	RC	p
< 10 %	37	30 (81.1%)	0.179
≥ 10%	47	32 (68.1%)	

##### 4.3.2.2 Expresión de ciclina D1 (presencia ó ausencia de tinción en núcleos celulares)

Para el análisis estadístico se consideró como variable positiva la presencia de tinción nuclear para ciclina D1 y negativa la ausencia total de la misma, según lo descrito previamente<sup>107</sup>.

Ciclina D1	Nº pacientes	RC	p
Negativa	54	42 (77.8%)	0.267
Positiva	30	20 (66.7%)	

#### 4.3.2.3 Expresión de ciclina D2 (porcentaje de núcleos celulares teñidos en inmunohistoquímica)

Se consideró la variable como positiva ó negativa tomando como punto de corte el 5% de tinción nuclear, punto que se corresponde con el percentil 50 de la muestra.

Ciclina D2	Nº pacientes	RC	p
< 5 %	38	31 (81.6%)	<i>0.141</i>
≥ 5%	46	31 (67.4%)	

#### 4.3.2.4 Expresión de mdm2 (porcentaje de núcleos celulares teñidos en inmunohistoquímica)

Para el análisis estadístico se consideró la variable como positiva ó negativa tomando como punto de corte el 40% de tinción nuclear, punto que se corresponde con el percentil 50 de la muestra.

Mdm2	Nº pacientes	RC	p
≤ 40 %	36	27 (75%)	<i>0.830</i>
> 40%	48	35 (72.9%)	

## **4.4 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA**

El segundo objetivo del estudio es determinar el impacto pronóstico de los marcadores moleculares estudiados en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y en la supervivencia global (SG) de los pacientes. También hemos evaluado la influencia en dichas variables de los factores pronósticos clásicos.

### **4.4.1 Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global**

Con una mediana de seguimiento de 10 años, (1.8-25) la mediana de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en nuestra serie fue de 7.6 años (0.125-25) y la de supervivencia global (SG) de 8.6 años (0.125-25). El índice de SLE y SG estimado a 5 años fue de un 74%, y un 80% respectivamente.

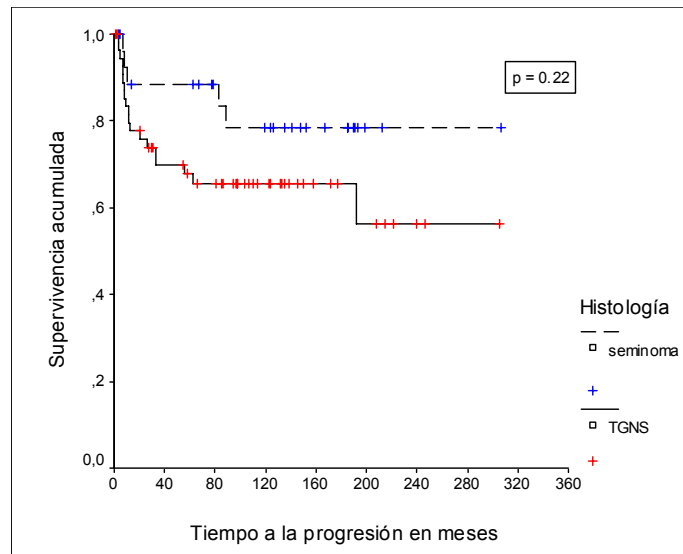
### **4.4.2 Impacto de los factores pronósticos clásicos en la SLE y la SG**

Como variables para el análisis de supervivencia se incluyeron los subgrupos histológicos más numerosos (seminoma clásico, carcinoma embrionario y tumor del seno endodérmico), y los factores pronósticos clásicos descritos previamente (presencia de metástasis viscerales no pulmonares al diagnóstico, localización del tumor primario, elevación de los niveles séricos de AFP, BHCG y LDH, y grupo de riesgo según la clasificación del IGCCCG).

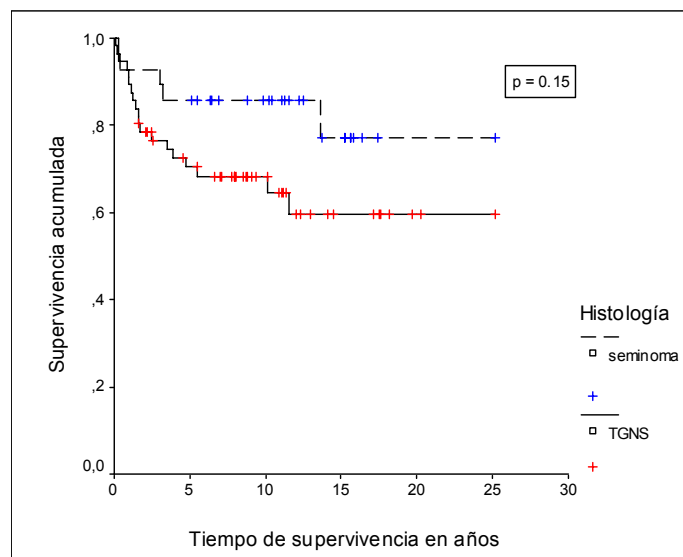
#### **4.4.2.1 Histología: Seminoma clásico**

Diecinueve de los 84 pacientes (22.6%) presentaron histología de seminoma clásico puro. Las curvas de Kaplan-Meier para la estimación de SLE y SG sugieren un mejor pronóstico en estos pacientes (Fig. 13a y 13b) sin significación estadística en el análisis univariante ( $p = 0.22$  y  $p = 0.15$  respectivamente).

**Fig. 13a. SLE en seminomas y no seminomas**



**Fig. 13b. SG en seminomas y no seminomas**

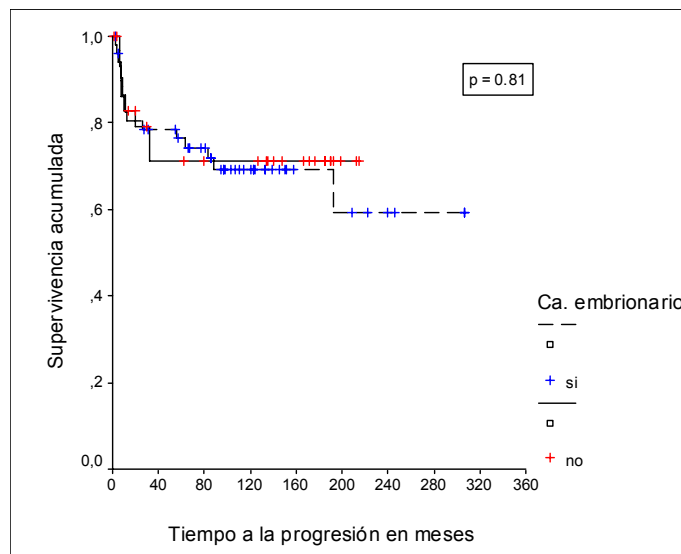




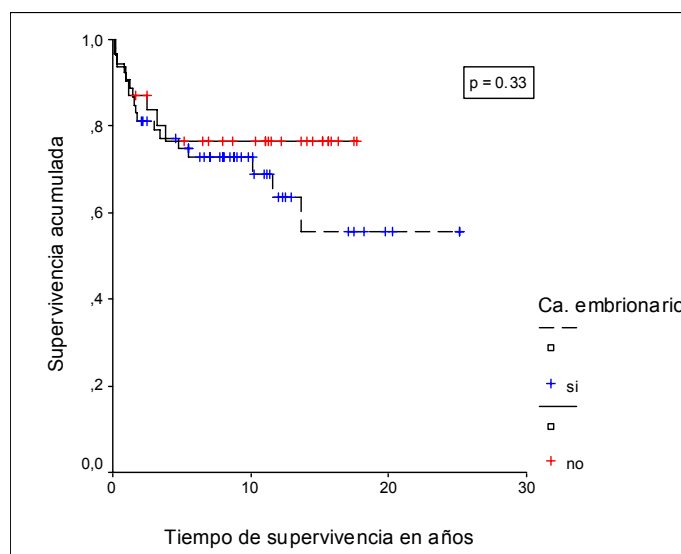
#### 4.4.2.2 Histología: Presencia de carcinoma embrionario

En el 63.1% de los casos (53 pacientes) se objetivó presencia de carcinoma embrionario en el tumor germinal como histología secundaria. Las curvas de Kaplan-Meier para la estimación de SLE y de SG no han demostrado significación estadística.

**Fig. 14a. SLE según la presencia ó no de carcinoma embrionario**



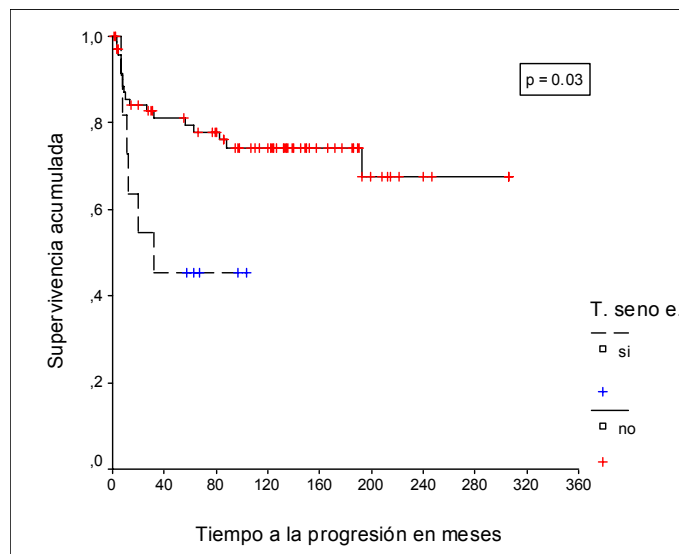
**Fig. 14b. SG según la presencia ó no de carcinoma embrionario**



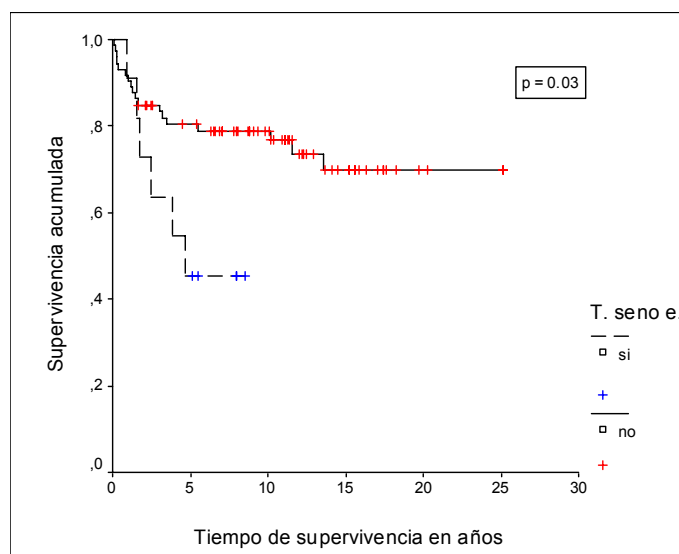
#### 4.4.2.3 Histología: Presencia de tumor del seno endodérmico

La presencia de tumor del seno endodérmico como histología secundaria en 11 de los 84 pacientes resultó un factor pronóstico negativo en el análisis univariante de supervivencia tanto para la SLE como para la SG ( HR 2.7, 95% IC 1.08-7.09,  $p = 0.03$ ; y HR 2.84, 95% IC 1.1-7.3,  $p = 0.03$ ).

**Fig. 15a. SLE según la presencia ó no de tumor del seno endodérmico**



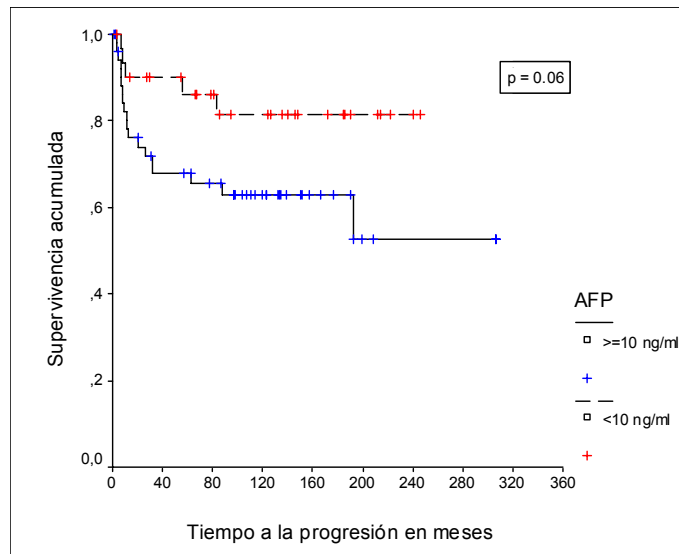
**Fig. 15b. SG según la presencia ó no de tumor del seno endodérmico**



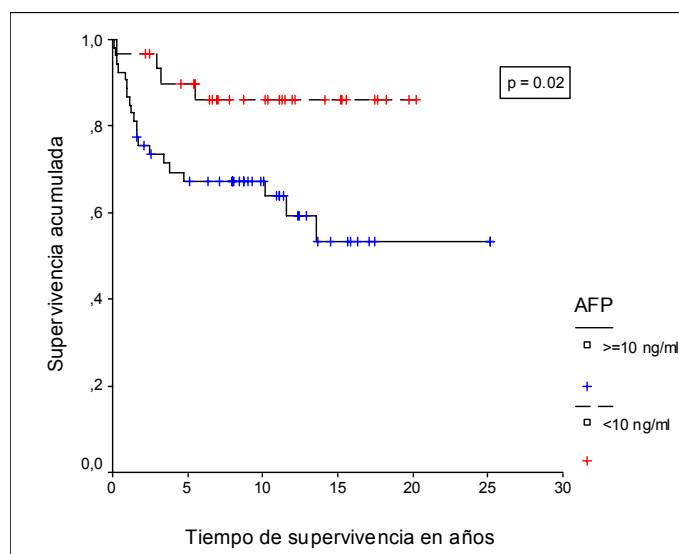
#### 4.4.2.4 Elevación de AFP en suero

En nuestra serie la relación de una AFP  $\geq 10$  ng/ml con la SLE no llegó a criterios de significación estadística pero muestra una fuerte tendencia a determinar un peor pronóstico (HR 2.57, 95%, IC 0.95-6.8;  $p = 0.06$ ). Para la SG es un factor pronóstico negativo (HR 3.4, 95%, IC 1.18-10.2;  $p = 0.02$ ).

**Fig. 16a. SLE en función del valor de AFP sérica**



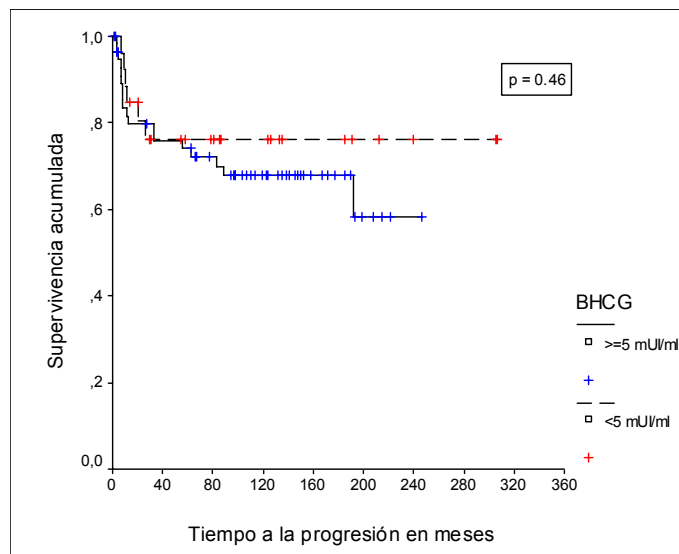
**Fig. 16b. SG en función del valor de AFP sérica**



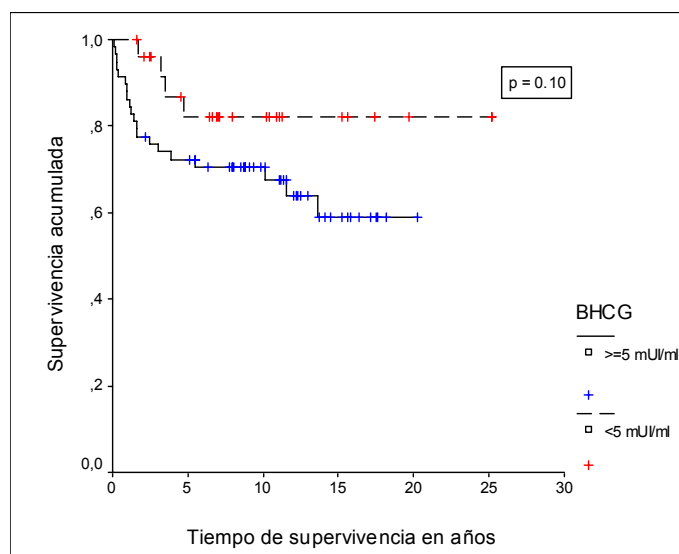
#### 4.4.2.5 Elevación de BHCG en suero

Las curvas de de Kaplan-Meier para la estimación de SLE no han demostrado diferencias significativas, y en SG sugieren un mejor pronóstico en pacientes con BHCG <5 mIU/ml en suero sin llegar a la significación estadística en el análisis univariante ( $p = 0.46$  y  $p = 0.10$  respectivamente).

**Fig. 17a. SLE en función del valor de BHCG sérica**



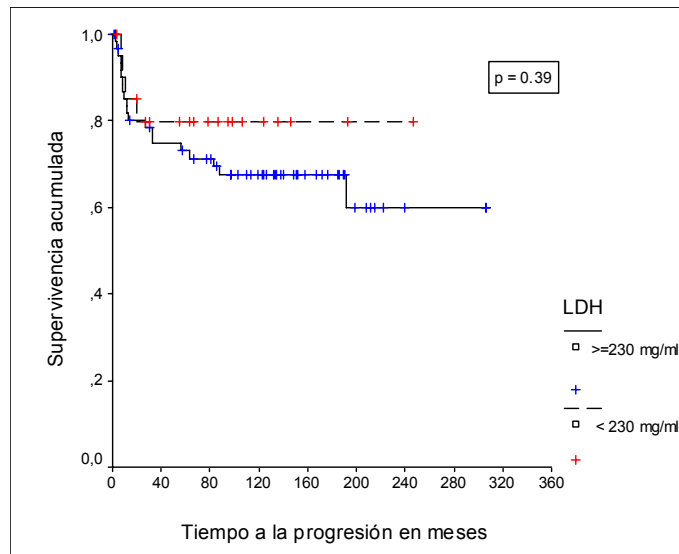
**Fig. 17b. SG en función del valor de BHCG sérica**



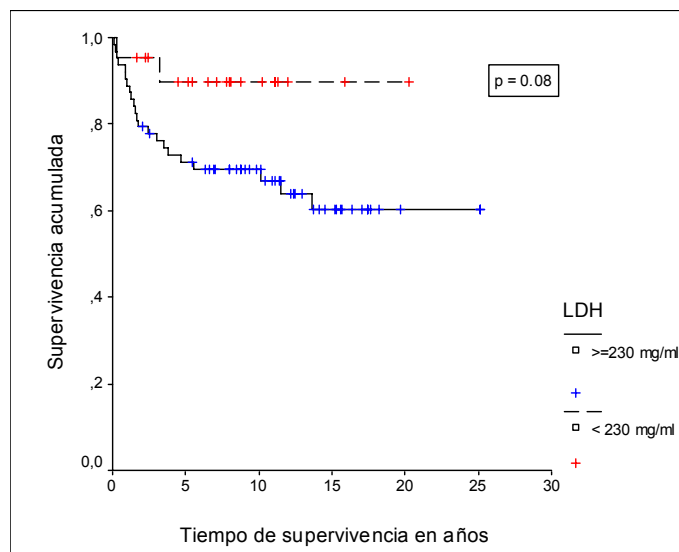
#### 4.4.2.6 Elevación de LDH en suero

La elevación sérica de LDH por encima del límite superior normal no ha demostrado diferencias pronósticas significativas en la curva de Kaplan-Meier para la estimación de SLE ( $p = 0.39$ ), y en la SG indica una clara tendencia hacia un peor pronóstico ( $p = 0.08$ ).

**Fig. 18a. SLE en función del valor de LDH sérica**



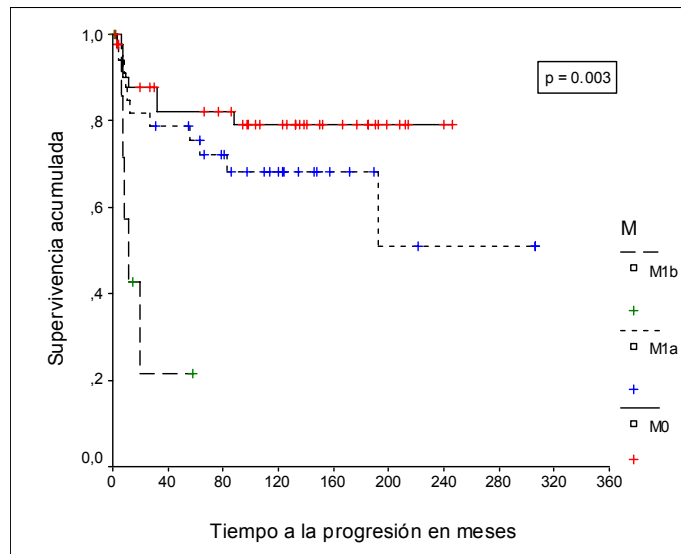
**Fig. 18b. SG en función del valor de LDH sérica**



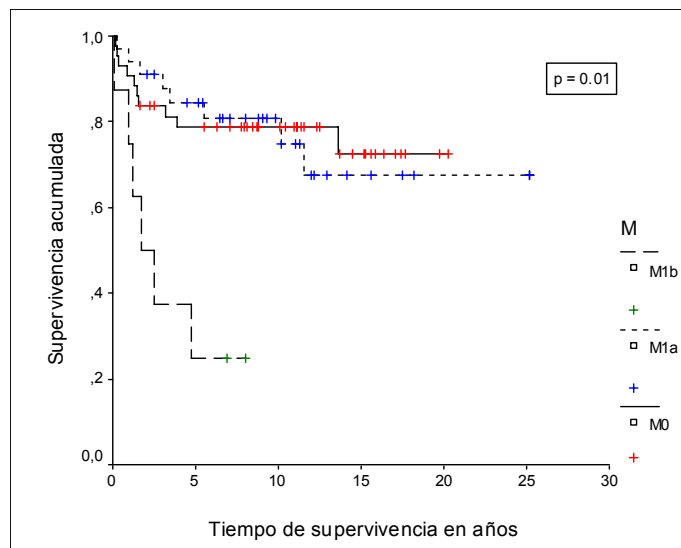
#### 4.4.2.7 Presencia de metástasis viscerales no pulmonares al diagnóstico.

El estadio M1b al diagnóstico demostró ser un factor pronóstico negativo estadísticamente significativo tanto para la SLE (HR 2.3, 95% IC 1.3-4.8;  $p = 0.003$ ) como para la SG (HR 2.08, 95% IC 1.14-3.8;  $p = 0.01$ ).

**Fig. 19a. SLE según estadio M**



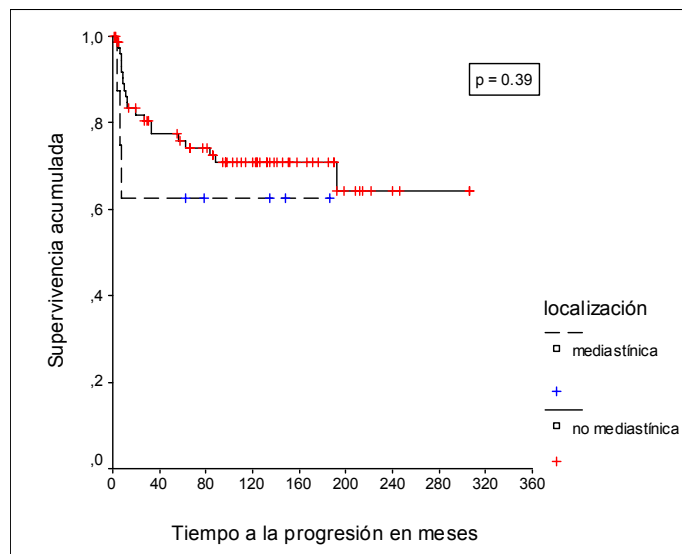
**Fig. 19b. SG según estadio M**



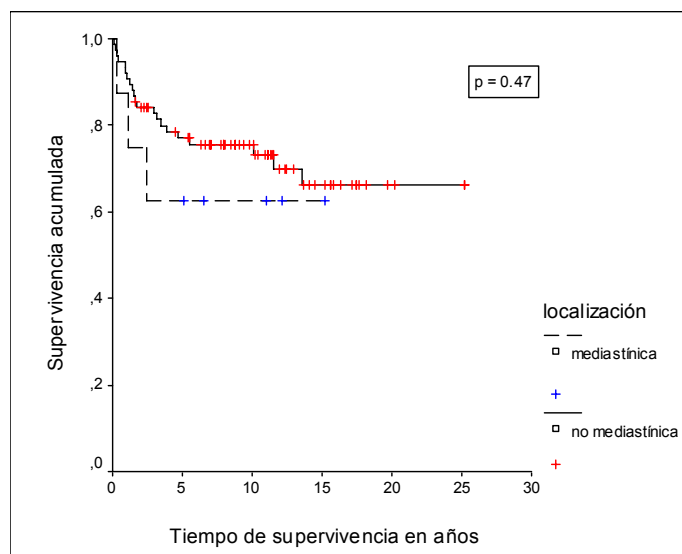
#### 4.4.2.8 Localización del tumor primario

Las curvas de Kaplan-Meier para la estimación de SLE y SG no han demostrado diferencias significativas entre el subgrupo de pacientes con tumores de localización primaria mediastínica y los testiculares primarios ( $p = 0.39$  y  $p = 0.47$  respectivamente).

**Fig. 20a. SLE según la localización del tumor primario**



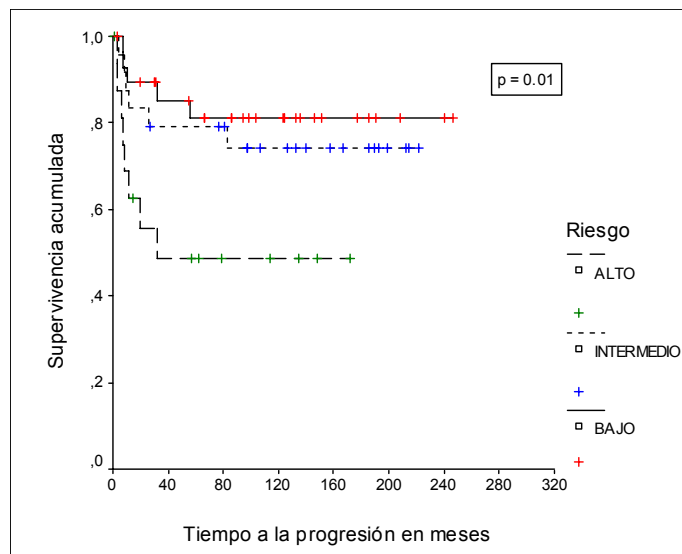
**Fig. 20b. SG según la localización del tumor primario**



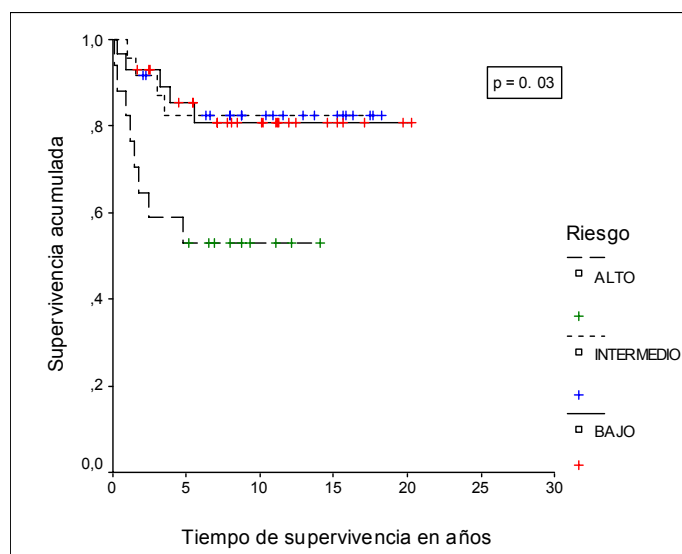
#### 4.4.2.9 Grupo de riesgo según la clasificación del IGCCCG

En el análisis de supervivencia el grupo de alto riesgo según la clasificación del IGCCCG demostró ser un valor pronóstico negativo estadísticamente significativo tanto para la SLE (HR 2.01, 95% IC 1.11-3.62;  $p = 0.01$ ) como para la SG (HR 1.9, 95% IC 1.04-3.55;  $p = 0.03$ ).

**Fig. 21a. SLE según el grupo de riesgo IGCCCG**



**Fig. 21b. SG según el grupo de riesgo IGCCCG**



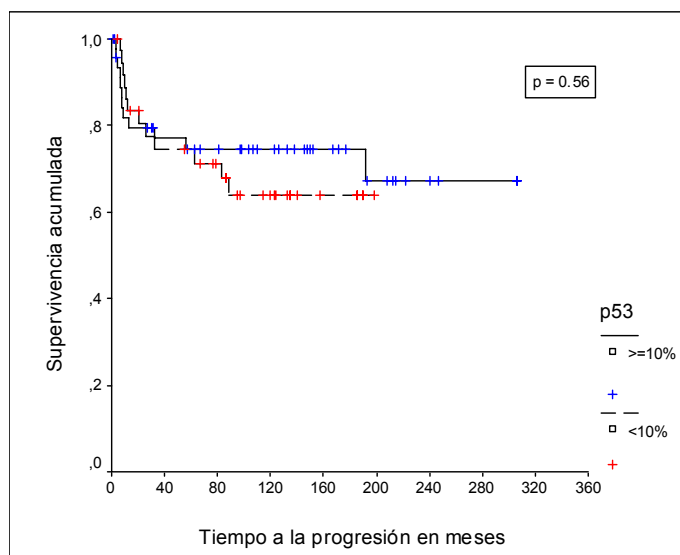


### 4.4.3 Impacto de los marcadores moleculares en la SLE y la SG

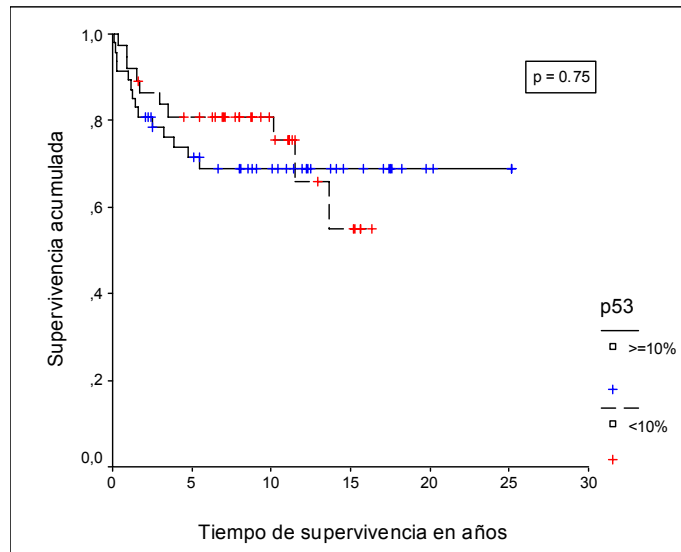
#### 4.4.3.1 Expresión de p53

En el análisis univariante la expresión de p53 medida por inmunohistoquímica en las muestras tumorales (variable binaria: positiva ó negativa tomando como punto de corte el 10% de tinción nuclear, punto que se corresponde con el percentil 50 de la muestra) no determinó diferencias significativas en la SLE ni en la SG de los pacientes ( $p = 0.56$  y  $p = 0.75$  respectivamente).

**Fig. 22a. SLE según la expresión de p53**



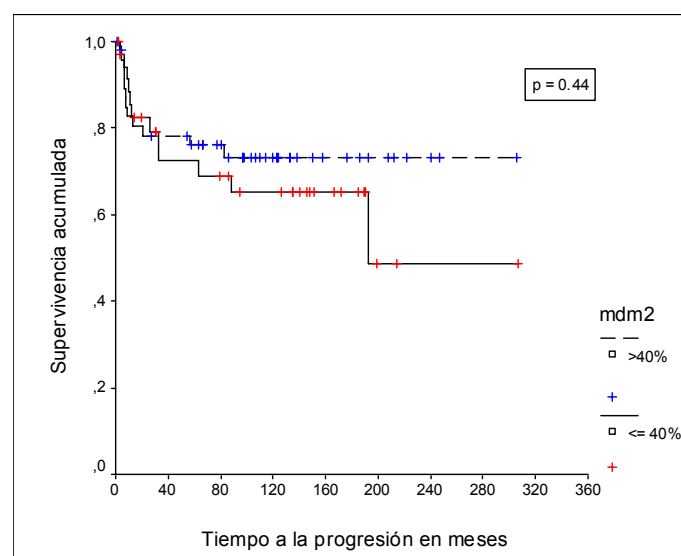
**Fig. 22b. SG según la expresión de p53**



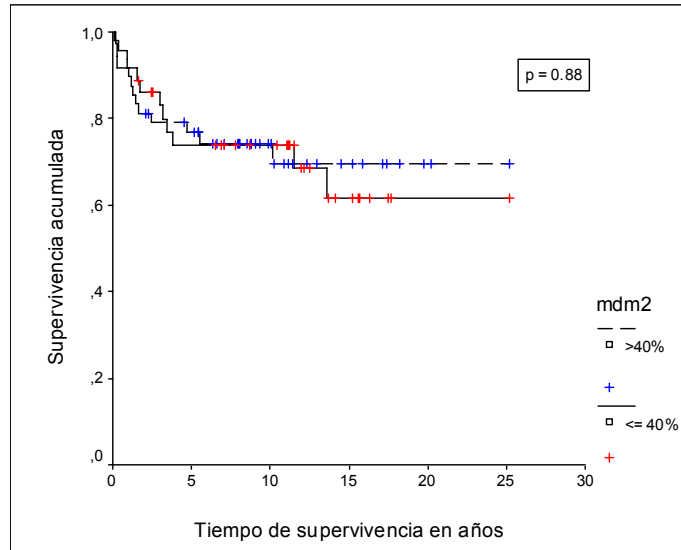
#### 4.4.3.2 Expresión de mdm2

La expresión tisular de mdm2 por debajo del 40% (punto que se corresponde con el percentil 50 de la muestra) no determinó diferencias significativas en la SLE ni en la SG de los pacientes ( $p = 0.44$  y  $p = 0.88$  respectivamente).

**Fig. 23a. SLE según la expresión de mdm2**



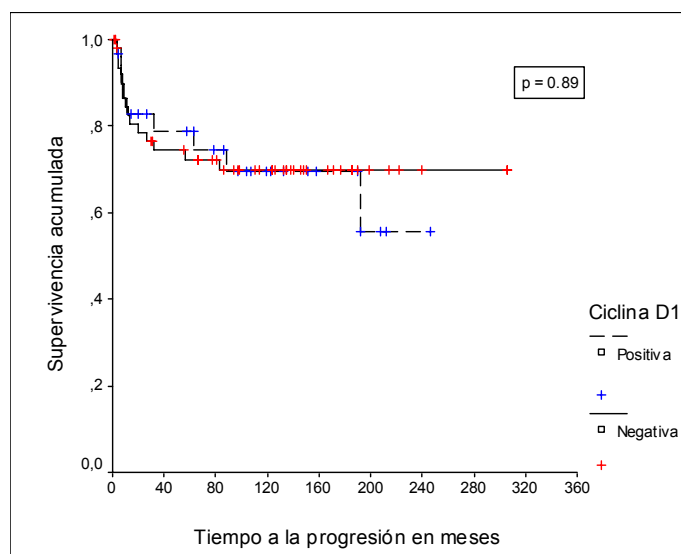
**Fig. 23b. SG según la expresión de mdm2**



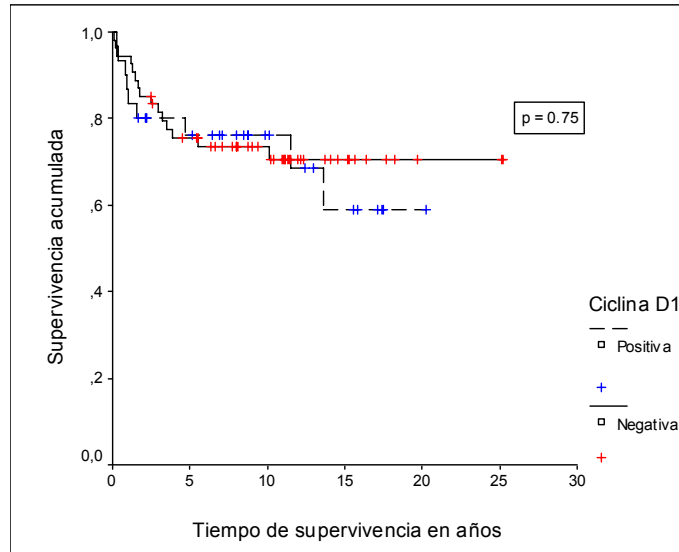
#### 4.4.3.3 Expresión de Ciclina D1

La expresión de ciclina D1 medida por inmunohistoquímica en las muestras tumorales (variable binaria: presencia ó ausencia de expresión) no demostró diferencias significativas en la SLE ni en la SG de los pacientes ( $p = 0.89$  y  $p = 0.75$  respectivamente).

**Fig. 24a. SLE según la expresión de Ciclina D1**



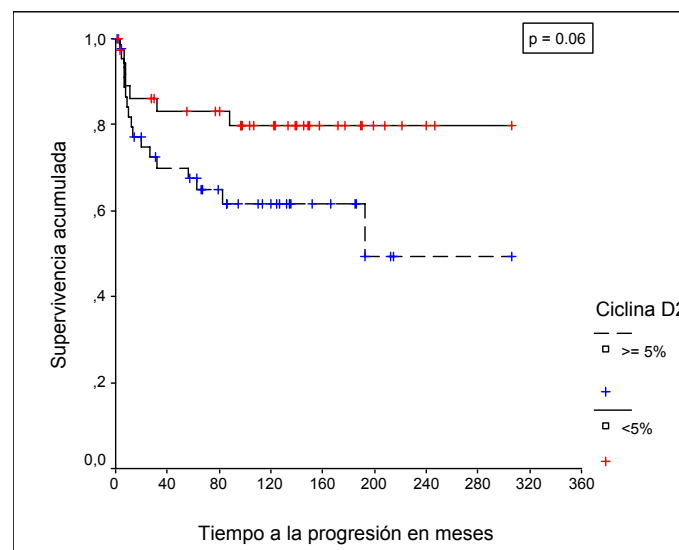
**Fig. 24b. SG según la expresión de Ciclina D1**



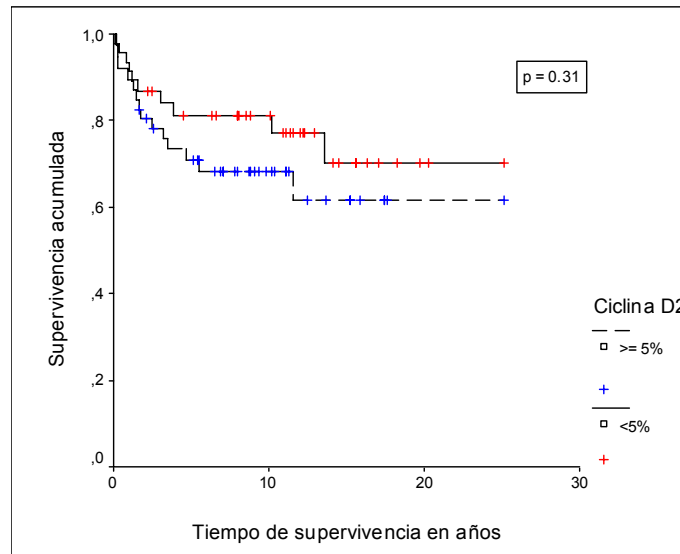
#### 4.4.3.2 Expresión de Ciclina D2

La expresión de Ciclina D2 en las muestras tumorales (variable binaria: positiva ó negativa tomando como punto de corte el 5% de tinción nuclear) muestra una fuerte tendencia a determinar una menor SLE (HR 2.26, 95%, IC 0.95-5.4;  $p = 0.06$ ), pero no determinó diferencias significativas en la SG ( $p = 0.31$ ).

**Fig. 25a. SLE según la expresión de Ciclina D2**



**Fig. 25b. SG según la expresión de Ciclina D2**



#### 4.4.4 Análisis univariante

Los resultados del análisis univariante para SLE y para SG se encuentran reflejados en las Tablas 13 y 14.

**Tabla 13.** Análisis univariante para SLE

Factor pronóstico	Supervivencia libre de enfermedad		
	HR	IC 95%	P
Seminoma clásico	0.47	0.17-1.26	0.22
Presencia de carcinoma embrionario	1.10	0.47-2.59	0.81
Presencia de tumor del seno endodérmico	2.77	1.08-7.09	<b>0.03</b>
AFP > 10 ng/ml	2.57	0.95-6.98	0.06
BHCG > 5 UI/ml	1.41	0.56-3.57	0.46
LDH > 230 mg/ml	1.60	0.54-7.08	0.39
M viscerales no pulmonares	2.60	1.38-4.89	<b>0.003</b>
Localización del tumor primario	1.69	0.50-5.71	0.39
Alto riesgo IGCCCGC	2.01	1.1-3.6	<b>0.01</b>
Expresión de p53 > 10%	0.78	0.34-1.77	0.56
Expresión de mdm2 > 40%	0.73	0.32-1.63	0.44
Presencia de expresión de ciclina D1	1.05	0.46-2.42	0.89
Expresión de ciclina D2 > 5%	2.26	0.93-5.47	0.06

M: metástasis; t: tumor; HR: hazard ratio; 95% IC: Intervalo de confianza del 95%.

**Tabla 14.** Análisis univariante para SG

Factor pronóstico	Supervivencia global		
	HR	IC 95%	P
Seminoma clásico	0.42	0.15-1.14	0.15
Presencia de carcinoma embrionario	1.55	0.63-3.75	0.33
Presencia de tumor del seno endodérmico	2.84	1.10-7.36	<b>0.03</b>
AFP > 10 ng/ml	3.48	1.18-10.2	<b>0.02</b>
BHCG > 5 UI/ml	2.41	0.82-7.08	0.10
LDH > 230 mg/ml	3.60	0.84-15.3	0.08
M viscerales no pulmonares	2.08	1.14-3.82	<b>0.01</b>
Localización del tumor primario	1.52	0.46-5.2	0.47
Alto riesgo IGCCCGC	1.92	1.04-3.55	<b>0.03</b>
Expresión de p53 > 10%	1.13	0.50-2.57	0.75
Expresión de mdm2 > 40%	0.94	0.42-2.11	0.88
Presencia de expresión de ciclina D1	0.87	0.38-2.00	0.75
Expresión de ciclina D2 > 5%	1.53	0.66-3.51	0.31

M: metástasis; t: tumor; HR: hazard ratio; 95% IC: Intervalo de confianza del 95%.

#### 4.4.5 Análisis multivariante

Para determinar el impacto real tanto de los factores pronósticos clásicos como de los marcadores moleculares en la SLE y SG de los pacientes con TCGs de nuestra serie se realizó un análisis multivariante según el método de Cox. Se utilizó un proceso de selección anterógrada escalonada (“forward stepwise”) para desarrollar un modelo de regresión de riesgos proporcionales que permitiera estimar la importancia relativa de los distintos factores pronósticos en la supervivencia. Las variables incluidas en el modelo fueron aquellas que en el análisis univariante obtuvieron un valor de  $p \leq 0.1$ .

El estadio M y el valor de AFP fueron significativos como predictores de SLE. Respecto a la SG solo la presencia de metástasis viscerales no pulmonares alcanzó la significación estadística (Tablas 15a y 15b).

**Tabla 15a.** Predictores de SLE en el análisis multivariante

Covariable	Supervivencia libre de enfermedad		
	HR	95% IC	P
M viscerales no pulmonares	2.77	1.44-5.31	0.002
AFP >10 ng/ml	1.09	1.00-1.18	0.049

M: metástasis; HR: hazard ratio; 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. Solo han sido incluidas en la tabla las variables significativas.

**Tabla 15b.** Predictores de SG en el análisis multivariante

Covariable	Supervivencia global		
	HR	95% IC	P
M viscerales no pulmonares	2.64	1.36-5.09	0.003

M: metástasis; HR: hazard ratio; 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. Solo han sido incluidas en la tabla las variables significativas.



## **5. DISCUSIÓN**

Los tumores de células germinales en el varón se ha convertido en las últimas tres décadas en el modelo de neoplasia sólida curable. El factor fundamental en su alta tasa de curaciones es su extraordinaria sensibilidad a la quimioterapia basada en cisplatino. Aun así, entre el 20 y el 30% de los pacientes con enfermedad avanzada fallecen por su tumor.

Numerosas variables clínicas, serológicas y moleculares han sido estudiadas con el objetivo de definir subgrupos de pacientes con pronóstico homogéneo. Los sistemas de estratificación de riesgo, y entre ellos la clasificación pronóstica creada por el International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG)<sup>32</sup>, han permitido diseñar estrategias terapéuticas específicas en los grupos de mayor y menor riesgo. En los de bajo riesgo el objetivo del tratamiento ha sido reducir la toxicidad sin comprometer la eficacia, y en los pacientes de riesgo intermedio y alto mejorar la eficacia con una toxicidad aceptable. A pesar de ello en torno a un 5-10% de los pacientes de bajo riesgo, un 15-20% de los de riesgo intermedio y el 40-50% de los pacientes de alto riesgo no alcanzan una remisión completa duradera.

La quimiosensibilidad de este tipo de neoplasias y los mecanismos de resistencia presentes ó desarrollados por los TCGs refractarios han sido y son objeto de estudio por parte de diversos grupos. Los principales mecanismos de resistencia podrían agruparse en: (1) Mecanismos que modifican la concentración intracelular de cisplatino; (2) Alteración de las vías de reparación del ADN; (3) Disfunción de los sistemas reguladores de apoptosis; (4) Factores de crecimiento celular y receptores tipo tirosina-quinasa; y (5) Proteínas moduladoras del ciclo celular.

Con el objetivo de identificar marcadores biológicos y moleculares de quimio-resistencia en estas neoplasias nuestra investigación se ha centrado en el estudio de proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis, como p53 y mdm2, y en proteínas moduladoras del ciclo celular (Ciclinas D1 y D2).

Se analizaron 109 piezas histológicas tumorales procedentes de 84 pacientes diagnosticados de TCGs avanzados que precisaron tratamiento sistémico con cisplatino.

En un primer paso se realizó un análisis interno de la población estudiada para evaluar la significación en la misma de los factores pronósticos clásicos. La presencia de metástasis viscerales no pulmonares, los niveles séricos de AFP y el riesgo según la clasificación del IGCCCG demostraron ser factores pronósticos con significación estadística al evaluar su impacto en la SG y SLE. Estos resultados coinciden con los publicados previamente y otorgan validez a la población del estudio.

Cabe destacar, entre los factores pronósticos clásicos analizados, la presencia de tumor del seno endodérmico como histología secundaria. En nuestra serie dicha variable se ha comportado como un factor de mal pronóstico estadísticamente significativo en el análisis univariante tanto para la SLE ( $p = 0.03$ ) como para la SG ( $p = 0.03$ ), no confirmado como factor pronóstico independiente en el análisis multivariante. Los 11 pacientes con dicha histología secundaria tenían TCGs mixtos con más de 3 histologías en el tumor, 5 de ellos presentaban metástasis viscerales no pulmonares al diagnóstico, 6 eran tumores de alto riesgo y 2 de intermedio según la clasificación del IGCCCG. Todo esto nos hace pensar que la presencia de tumor del seno endodérmico en nuestra serie se asocia a tumores mixtos con características de agresividad, y sería necesario el análisis de un mayor número de pacientes para poder determinar si realmente se trata de un factor pronóstico negativo independiente.

Una vez constatada la validez de la población a estudiar se procedió al análisis de la expresión tisular mediante técnicas de IHQ de los diferentes marcadores moleculares.

## 5.1 MARCADORES MOLECULARES

### 5.1.1 p53

La proteína p53 es un factor de transcripción nuclear que se une a secuencias específicas de ADN activando determinados genes diana (genes “downstream”) como *p21<sup>WAF1</sup>*, *MDM*”, *Bax*, y *PUMA*, cuyos productos desencadenan mecanismos de arresto del ciclo celular y/o apoptosis; de esta forma previene la multiplicación de células genéticamente dañadas<sup>120</sup>. Esto ha llevado a considerar a p53 como “el guardián del genoma”<sup>121</sup>. Varios trabajos publicados han demostrado que el status de p53 es uno de los puntos clave en la sensibilidad celular tumoral a agentes que lesionan el ADN, como el cisplatino<sup>122</sup>, aunque es probable que la implicación de p53 en la quimiosensibilidad sea específica de cada tipo de neoplasia<sup>83</sup>.

En la gran mayoría de los TCGs humanos la proteína p53 aparece sobre-expresada y el gen TP53, a diferencia de lo que ocurre en otros tipos tumorales, no presenta mutaciones, se encuentra en su forma nativa (“wild-type”)<sup>86</sup>. Este hallazgo se relacionó inicialmente con la alta quimiosensibilidad de dichos tumores. Sin embargo, la causa de la sobre-expresión de p53 en ausencia de mutaciones del gen, y su posible impacto en la respuesta al tratamiento quimioterápico están aún por determinar y son objeto de estudio y discusión en muchos de los trabajos publicados<sup>87, 123</sup>.

#### 5.1.1.1 Expresión de p53 y respuesta a cisplatino

La expresión inmunohistoquímica de p53 fue analizada en las 109 muestras histológicas correspondientes a los 84 pacientes del estudio. Tomando el percentil 50 (10%) como punto de corte 56 muestras (52.4%) fueron positivas para p53, aunque solo 18 (16.5%) presentaron expresión tisular intensa (>30%). Estos resultados son similares a los reportados previamente por Eid et al.<sup>124</sup>, así como el hecho de que en el 100% de los seminomas se detectó inmunoreactividad para

p53. Sin embargo, y coincidiendo en este caso con los resultados de Kersemaeckers y cols.<sup>87</sup>, en nuestro estudio la expresión tisular de p53 no se relacionó estadísticamente con la respuesta al tratamiento con cisplatino ( $p = 0.17$ ).

Varios autores han estudiado la relación de p53, y su gen TP53, con la sensibilidad de los TCGs al cisplatino. Cabe destacar el trabajo de Kersemaeckers y cols.<sup>87</sup>, en el que hacen una crítica metodológica de los estudios publicados anteriormente y analizan una serie propia, concluyendo que los niveles de TP53 nativo y de proteína p53 expresada (detectada en tejido parafinado mediante técnicas de inmunohistoquímica) no se relacionan directamente con la sensibilidad al tratamiento. Sin embargo, Kerley-Hamilton y cols. en un exhaustivo trabajo con líneas celulares de TCG demostraron que dichas células presentan una respuesta transcripcional específica al tratamiento con cisplatino, dependiente de p53<sup>123</sup>. Estos últimos investigadores plantean la hipótesis de que la hiperactivación de p53 presente en este tipo de neoplasias puede conferir una pequeña pero significativa susceptibilidad a la quimioterapia en los TCGs, que no encontramos en otros tumores sólidos.

En cualquier caso la mayoría de los autores coinciden en que la p53 sobre-expresada en TCGs no se corresponde con una intensa actividad apoptótica dependiente de esta y por lo tanto debe existir algún tipo de inhibición de su actividad en la reacción celular al cisplatino. Recientemente se han abierto varias vías de investigación en este sentido. En primer lugar destacan los estudios centrados en las isoformas de p53 (cuya expresión puede ser modulada *in vivo* en respuesta a la quimioterapia<sup>125</sup>) y en las proteínas p63 y p73. Estas últimas, además de ser necesarias para la apoptosis dependiente de p53 en respuesta a lesiones del ADN<sup>126</sup>, podrían incluso actuar como factores dominantes negativos inhibiendo la activación de la transcripción por p53 y de ese modo estar implicadas en la tumorigénesis y sensibilidad a quimioterapia en TCGs<sup>127</sup>. La segunda vía de investigación en la relación p53-cisplatino es el estudio de la silenciación epigenética mediante la detección de hipermetilación en el promotor

de los genes diana de p53, aún sin resultados concluyentes<sup>128</sup>. Por último, se han descrito recientemente dos micro-ARNs, hsa-mir-372 y 373, hiper-expresados en TCGs pero no en tejido testicular normal, que inactivan p53 mediante el bloqueo de la vía de señalización dependiente de CDK2 (proteína quinasa dependiente de ciclinas 2), y se ha demostrado que esta inactivación permite la transformación neoplásica con p53 nativo intacto<sup>129, 130</sup>.

#### **5.1.1.2 Expresión de p53 e impacto pronóstico.**

Son pocos los trabajos publicados que analizan el impacto pronóstico de p53 en los TCGs (Tabla 16). Destacan los estudios de Ulbright y cols. (centrado en el papel de p53 como predictora de enfermedad metastásica oculta en estadios tempranos<sup>131</sup>) y de Eid y cols.<sup>132</sup>. En este último los autores analizan la expresión de p53 por medio de técnicas de inmuohistoquímica en tejido parafinado de biopsias de 77 pacientes con tumor de células germinales, 27 de ellos en estadio avanzado (IIb-III). Sus resultados muestran una correlación inversa significativa entre la expresión p53, el estadio de la enfermedad, y la respuesta al cisplatino, de forma que una expresión de p53 débil ó negativa se correlaciona con estadios más avanzados, peor respuesta a cisplatino, y por lo tanto con un peor pronóstico. En nuestra serie de 84 tumores de células germinales avanzados no hemos encontrado ninguna relación significativa entre la expresión de p53 y supervivencia global ( $p = 0.75$ ) ó supervivencia libre de enfermedad ( $p = 0.56$ ), por lo cual no podemos afirmar que la expresión de dicha proteína tenga algún impacto pronóstico.

**Tabla 16.** Expresión tisular de p53 y TCGs testiculares. Trabajos seleccionados

Primer Autor (ref)	Número de pacientes	Histología	Anticuerpo*	Tinción global (% de pacientes)	Fracción de tinción (% de pacientes)		
					0-10%	10-30%	> 30%
Kersemaekers <sup>87</sup>	74(35)F	S / NS	Do-7	74	82r/50nr	12r/33nr	6r/17nr
Eid <sup>132</sup>	77	S / NS	Do-7	91	-¶	-	-
Riou <sup>133</sup>	25	S / NS	CM1, Do-7	67	8	42	25
Baltaci <sup>134</sup>	24	S / NS	Do-7	83	-	-	-
Heidenreich <sup>135</sup>	149	S / NS	Signet lab.	95	-	-	-
Chou <sup>136</sup>	10	NS	Do-1	80	0	0	80
Albers <sup>137</sup>	62	NS	PAb1801	99	24	23	52
Lewis <sup>138</sup>	113	S / NS	-	93	-	52**	41¥
Ulbright <sup>131</sup>	69	NS	PAb 1801	49	26	20	3
Bartkova <sup>139</sup>	107	S / NS	CM1, PAb 1801, PAb 421	84	37	47H	
DeRiese <sup>140</sup>	84	NS	-	40	19	19	2
Bokemeyer <sup>141</sup>	16	S / NS	PAb 1801	88	25	13	62
Mazumdar <sup>31</sup>	95	NS	Do-7	10φ	-	-	-
<b>Garcia-Velasco</b>	<b>84</b>	<b>S / NS</b>	<b>Do-7</b>	<b>80.7</b>	<b>48.6</b>	<b>34.9</b>	<b>16.5</b>

Abreviaturas: H, histología; S, seminoma; NS, no-seminoma; E I, estadio I, Ac, anticuerpo, Ampl gen, amplificación genética; pts, pacientes; DNE, datos no expuestos en el artículo; P, parafina; F, muestra en fresco congelada; r, pacientes con respuesta al tratamiento quimioterápico; nr, pacientes no respondedores.

\* Anticuerpos utilizados en los estudios: PAb 1801, Do-1 (Oncogene Science, Cambrige, MA); CM! (NovoCastr); Do-7 (Dako, Glostrup, Denmark); PAb 421 (referido en Bartkova et al.); Signet laboratories anti-p53.

\*\* Entre 0% y 25% células positivas.

¥ >25% células positivas.

H Entre 1% y 50% células positivas.

¶ Guiones (-) indican “no realizado” en el trabajo publicado.

‡ Solo 35 de los 74 pacientes del estudio se presentan con datos clínicos (estadio, respuesta al tratamiento...).

φ En el estudio se encontró una tinción media para p53 del 10% de núcleos celulares teñidos.

### 5.1.2 Mdm2

El gen MDM2, que se encuentra localizado en el cromosoma 12(12q13-q14), es un proto-oncogen responsable de la expresión de la proteína del mismo nombre mdm2. Esta proteína es una ubiquitina-ligasa capaz de autodestruirse ó promover la destrucción de sus ligandos, como p53, por medio de la ubiquitinización<sup>142</sup>. De este modo mdm2 regula la función de la proteína p53 como factor de transcripción favoreciendo su destrucción en situaciones de crecimiento normal. A su vez p53 es la responsable de la síntesis de mdm2 estableciéndose así un sistema de retroalimentación negativa. En situaciones de estrés ó agresión celular la fosforilación simultánea de ambas proteínas provoca la liberación de p53 y un aumento de su función como factor de transcripción, clave en los procesos de apoptosis y reparación celular, al mismo tiempo que aumenta la degradación de mdm2<sup>143</sup>.

En un 7% de los tumores malignos en humanos se ha objetivado sobre-expresión de la proteína mdm2, y aún con mayor frecuencia en sarcomas de partes blandas<sup>90</sup>. Este hallazgo se ha relacionado con resistencia a la quimioterapia y mal pronóstico vital en varios tipos de neoplasias malignas.

Pocos trabajos publicados estudian el papel de mdm2 en tumores de células germinales testiculares (Tabla 17), pero el hecho de que se hayan descrito frecuentes alteraciones citogenéticas en el cromosoma 12 en dichas neoplasias con implicación del locus de mdm2<sup>144</sup>, además de su papel fundamental en la regulación de los procesos de apoptosis, hacen que esta proteína despierte interés como posible marcador molecular de la exquisita sensibilidad a la quimioterapia que presentan estos tumores.



### 5.1.2.1 Expresión de mdm2 y respuesta a cisplatino

La expresión tisular de mdm2 en TCGs medida por técnicas de inmunohistoquímica ha sido objeto de investigación en dos estudios publicados hasta el momento. Ninguno de ellos estaba centrado en pacientes con TCG en estadio avanzado. En el trabajo publicado por Eid y cols.<sup>87</sup> se estudió la expresión de mdm2 en muestras de 81 pacientes no seleccionados, entre los que se incluyeron 37 pacientes en estadio I. En el estudio de Kersemaekers y cols.<sup>93</sup> se analizaron muestras de 39 pacientes no seleccionados y sin datos de seguimiento clínico, además de 17 pacientes considerados quimiosensibles (8 en estadio I) y 18 quimiorresistentes (3 en estadio I). A diferencia de la serie publicada por Eid y cols., en la que el porcentaje de muestras con expresión de mdm2 fue de un 55.55%, en nuestro estudio, en el que solo se incluyeron 2 pacientes en estadio Is, el 90% de las muestras (n = 98) presentaron expresión nuclear de mdm2 y en el 50% de los casos esta expresión superó el 40% de núcleos celulares teñidos (percentil 50; p50). La mayoría de los seminomas clásicos de nuestra serie (26 muestras, un 89.7% de los mismos) presentaron tinción baja ó moderada para mdm2 (< 60%) en contraste con la fuerte expresión encontrada en los no-seminomas (tinción >60% en 38 muestras, el 50% de los TGNS).

En el estudio de Kersemaekers y cols. se describen diferencias de expresión de la proteína según el tipo histológico (menor en seminomas que en no-seminomas) y un mayor número de casos positivos dentro del grupo de pacientes quimiorresistentes (15 de 18); este último dato los autores lo atribuyen a la fuerte expresión de mdm2 en el componente de carcinoma embrionario presente en los tumores refractarios y no consideran que la expresión de mdm2 interfiera realmente con la quimiosensibilidad de los TCGs. En nuestra serie, tomando el percentil 50 como punto de corte para definir la variable como positiva ó negativa, no se encontró ninguna relación significativa entre la expresión de mdm2 y la respuesta al cisplatino (p = 0.83). En un segundo análisis tomando como punto de corte el 5% de tinción nuclear (el utilizado en el estudio de Eid y cols.) la sobre-expresión de mdm2 resultó estadísticamente relacionada con una mejor respuesta

al cisplatino ( $p = 0.02$ ). En cualquier caso, dado que tan solo 4 de los 84 tumores de la serie presentaron una expresión de mdm2 menor del 5%, consideramos que el poder de la comparación realizada es escaso y sería recomendable un análisis con mayor número de pacientes.

En ausencia de mutaciones, la proteína p53 puede ser inactivada por diferentes mecanismos entre los que se incluye una super-inhibición por mdm2, lo cual se vería reflejado en una sobre-expresión tisular de esta última asociada a hipo-expresión de p53. En nuestro estudio no hemos objetivado ninguna relación entre la expresión tisular de mdm2 y la de p53, ni de éstas a su vez con la respuesta tumoral a cisplatino. Por todo ello coincidimos con Kersemaekers et al. al afirmar que la inactivación de p53 por mdm2 no parece ser la clave de la exquisita quimiosensibilidad de los TCGs.

En cualquier caso, el reducido número de pacientes incluidos en nuestro trabajo, y en los estudios publicados previamente, limita las posibilidades de obtener resultados estadísticamente significativos. Estamos de acuerdo con Oliver y cols.<sup>145</sup> en que para demostrar diferencias significativas, en caso de existir, sería necesario el análisis de cohortes de pacientes con TCGs avanzados más numerosas que las publicadas hasta el momento.

#### **5.1.2.2 Expresión de mdm2 e impacto pronóstico**

El único trabajo publicado hasta el momento en el que se relaciona la expresión tisular de mdm2 con el pronóstico de pacientes con TCGs es el de Eid y cols. Los autores, que por motivos no detallados en el artículo seleccionan el 5% de núcleos celulares teñidos como punto de corte para definir la expresión de mdm2 como positiva ó negativa, objetivaron una relación estadísticamente significativa entre expresión de mdm2 mayor del 5% y estadios clínicos más avanzados, mayor agresividad tumoral, y menor supervivencia. En nuestra serie la sobre-expresión de mdm2, tanto en el análisis inicial tomando como punto de corte el percentil 50 (40% de núcleos celulares teñidos), como en un segundo

análisis en el que se tomó como referencia el 5% de tinción nuclear, no evidenció diferencias significativas en la SLE ni en la SG de los pacientes.

**Tabla 17.** Mdm2 y TCGs testiculares. Estudios publicados

Primer Autor (ref)	Número de pacientes	Histología	Pacientes en Estadío I	Anticuerpo**	Tinción global (% pacientes)	Fracción de tinción (% de pacientes)		
						0-10%	10%-30%	> 30%
Kersemaekers <sup>87</sup>	35F	S / NS	11	SMP14	DNE	70r/28nr	6r/17nr	24r/55nr
Eid <sup>93</sup>	81	S / NS	37	1B10	55.5	44.4	13.5	41.9
Riou <sup>146</sup>	25	S / NS	25	-¶	-	-	-	-
Oliver <sup>145*</sup>	31	S / NS	DNE	DNE	-	-	-	29S/52NS
Fleischhaker <sup>147</sup>	40	S / NS	DNE	-	-	-	-	-
<b>Garcia-Velasco</b>	<b>84</b>	<b>S / NS</b>	<b>2</b>	<b>SMP14</b>	<b>90</b>	<b>9.5</b>	<b>21.5</b>	<b>69</b>

Abreviaturas: H, histología; S, seminoma; NS, no-seminoma; E I, estadío I, Ac, anticuerpo, Ampl gen, amplificación genética; pts, pacientes; DNE, datos no expuestos en el artículo; P, parafina; F, muestra en fresco congelada; r, pacientes con respuesta al tratamiento quimioterápico; nr, pacientes no respondedores.

\*Carta al director, el artículo con los datos detallados no está publicado.

\*\* Anticuerpos utilizados en los estudios: Mdm2 mouse monoclonal Ab1, clon SMP14, 1/50[Neomarkers, Fremont,CA]; NCL-Mdm2 mouse monoclonal antibody (clon 1B10, Novocastra, UK); Mdm2 mouse monoclonal AB, clon SMP14 (Dako, Glostrup, Denmark).

¶ Guiones (-) indican “no realizado” en el trabajo publicado.

‡ Solo 35 de los 74 pacientes del estudio se presentan con datos clínicos (estadío, respuesta al tratamiento...).

### 5.1.3 Ciclina D1

Las ciclinas son consideradas por algunos autores los “coreógrafos” del ciclo celular, ya que la oscilación de sus niveles en el interior de la célula marca el ritmo de progresión en los procesos de división celular<sup>148</sup>. En concreto las ciclinas del grupo D están implicadas en el paso por el punto de restricción (R), clave en la transición de la fase G1 a la fase S, mediante la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Además de esta función común a todas las ciclinas D, el complejo ciclina D1-CDK4 tiene la capacidad de acelerar la entrada de la célula en fase S incluso en ausencia de la proteína Rb, es decir, puede aumentar la replicación a través de una vía Rb-independiente<sup>104</sup>.

La amplificación del gen de la ciclina D1 y la sobre-expresión de su proteína correspondiente es una de las alteraciones más frecuentes de la vía del retinoblastoma en la patogénesis molecular de los tumores sólidos. En el caso del cáncer de mama se ha relacionado la ausencia de expresión tisular de ciclina D1 con una mayor supervivencia<sup>107</sup>, y en los linfomas del manto ha sido identificado como el oncogen Bcl1. En los TCGs el papel de esta proteína está poco estudiado; los resultados obtenidos en líneas celulares sugieren una función menos relevante que en otros tumores sólidos ó hematológicos<sup>149</sup>, y una mayor importancia de la ciclina D2 en el control del ciclo celular.

#### 5.1.3.1 Expresión de ciclina D1 y respuesta a cisplatino

En nuestro estudio el análisis inmunohistoquímico demostró ausencia de expresión de ciclina D1 en 73 de las 109 muestras histológicas (66.9% de los casos). Casi la totalidad de los seminomas fueron negativos (79.3%), y tan solo 18 muestras de carcinoma embrionario presentaron tinción leve-moderada para ciclina D1. Estos resultados concuerdan con los del único trabajo publicado hasta el momento en el que se analiza la expresión tisular de ciclina D1 medida por inmunohistoquímica. El equipo de Bartkova y cols.<sup>150</sup> estudió la expresión de las ciclinas D1, D2 y D3 en muestras de tejido testicular normal, CIS, y 32 tumores

testiculares. En esta serie, ninguno de los 16 seminomas incluidos mostró positividad para ciclina D1, lo cual coincide con lo objetivado en nuestro trabajo.

La relación entre la expresión tisular de ciclina D1 y la respuesta al cisplatino ha sido ampliamente estudiada en tumores escamosos de cabeza y cuello. Varios investigadores han descrito una relación significativa entre la escasa ó ausente expresión de la proteína y una mejor respuesta al tratamiento quimioterápico en dichos tumores. Sin embargo, en TCGs, aunque existen datos de una posible implicación de las ciclinas D en su exquisita quimiosensibilidad, todos los esfuerzos se han centrado en la ciclina D2 ya que parece que esta es la ciclina D predominante en este tipo de neoplasias. Bartkova y cols. describen ausencia de expresión de ciclina D1 en la gran mayoría de los tumores invasivos, pero no aportan datos de la evolución clínica. En nuestra serie la expresión tisular de ciclina D1 no se relacionó estadísticamente con quimiosensibilidad ó quimio-resistencia ( $p = 0.267$ ).

#### **5.1.3.2 Expresión de ciclina D1 e impacto pronóstico**

El posible impacto de la expresión tisular de ciclina D1 en la supervivencia de los pacientes con tumores de células germinales no ha sido objeto de estudio en la bibliografía documentada hasta el momento, por lo cual no disponemos de referencias para la discusión de nuestros resultados. En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna influencia significativa entre la expresión de dicha proteína y el pronóstico vital de los pacientes. Estos resultados podrían ser una muestra más de la escasa relevancia de la ciclina D1 en TCGs, aunque sería necesario un mayor número de pacientes para confirmarlo.

#### 5.1.4 Ciclina D2

La sobre-expresión de la ciclina D2 en muestras de CIS y TCGs, en contraste con la ausencia de expresión de la proteína en el tejido testicular normal, es el hallazgo más significativo en cuanto a alteraciones de proteínas moduladoras del ciclo celular en estas neoplasias<sup>116</sup>. El gen que codifica la ciclina D2 (CCND2) está localizado en el brazo corto del cromosoma 12, región del genoma que se encuentra habitualmente amplificada en los TCGs debido a la formación del isocromosoma i(12p). Este isocromosoma se ha descrito como un evento temprano en la tumorigénesis testicular y el incremento en el número de copias de i(12p) se ha relacionado con una mayor agresividad tumoral<sup>151</sup>. Dichos hallazgos han llevado a varios autores a buscar las claves de la quimiosensibilidad de estas neoplasias en las proteínas codificadas por los genes situados en el i(12p), y entre ellos en la ciclina D2. El grupo de Bartkova y cols. ha estudiado ampliamente los defectos del ciclo celular en tumores testiculares. Entre otros hallazgos han demostrado la fosforilación específica de la proteína Rb por los complejos ciclina D/cdk4 (a nivel de la serina 795) cuando esta se expresa en TCGs<sup>149</sup>, y un aumento de la proteína p27 (proteína kinasa que actúa como supresor tumoral y se encuentra ausente en múltiples tipos tumorales) en aquellos TCGs que sobre-expresan ciclina D2<sup>152</sup>. Basados en estos datos y en investigaciones propias, el grupo de Kukoski y Datta, que previamente había demostrado la relación significativa entre sobre-expresión de ciclina E y presencia de metástasis pulmonares en TCGs<sup>153</sup>, propone un modelo de función del ciclo celular en estas neoplasias que favorecería la proliferación mediante un aumento de entrada celular en fase S, y por lo tanto podría hacer a dichas células más susceptibles ante los agentes lesivos para el ADN<sup>154</sup>. En dicho modelo la sobre-expresión de ciclina D2 tiene un papel clave: el exceso de formación de complejos ciclina D2/cdk4 conllevaría un secuestro de toda la proteína p27 disponible, dejando a los complejos ciclina E/cdk2 libres de su efecto inhibitor, lo cual favorecería el tránsito de la fase G1 a la fase S. El incremento de células en fase S

en estos tumores se ha correlacionado también con la presencia de metástasis en TCGs<sup>155</sup> y puede ser clave en la quimiosensibilidad de estas neoplasias.

#### **5.1.4.1 Expresión de ciclina D2 y respuesta a cisplatino**

El primer trabajo de investigación publicado en el que se investigó la expresión tisular de ciclina D2 con técnicas de inmunohistoquímica fue el de Houldsworth y cols, en 1997<sup>116</sup>. Describieron una ausencia de expresión de la proteína en células testiculares normales y una expresión “aberrante” tanto en seminomas como en no-seminomas (con excepción de los componentes bien diferenciados de los teratomas maduros: cartílago y epidermis). Estos resultados fueron confirmados por Schmidt y cols. en un estudio en el que se investigó la amplificación genética de moduladores del ciclo celular en 58 muestras de TCGs, y se realizó el análisis inmunohistoquímico de expresión de ciclina D2 en 4 de ellos<sup>103</sup>. Pero los dos trabajos con mayor número de pacientes publicados hasta el momento son los de Bartkova<sup>150</sup> y Kukoski<sup>154</sup> (Tabla 18). Ambos coinciden al objetivar una sobre-expresión tisular de ciclina D2 en más del 80% de los seminomas y de los no-seminomas. En nuestro estudio, el análisis de las 109 muestras provenientes de 84 pacientes con TCGs demostró tinción nuclear de ciclina D2 en el 60.6% de los casos (66 muestras); resultaron negativos el 50% de los carcinomas embrionarios y casi el 60% de los seminomas (58.6%). Estos resultados son sensiblemente inferiores a los publicados previamente.



**Tabla 18.** Ciclina D2 y TCGs testiculares. Estudios publicados

Primer Autor (ref)	Número de pacientes	Histología	Estadíos	Anticuerpos*	Tinción global (% pacientes)	Tinción positiva (% de pacientes)	
						<i>Seminoma</i>	<i>Carcinoma Embrionario</i>
Houldsworth <sup>116</sup>	DNE	S / NS	-¶	C-17	-	Si†	Si
Bartkova <sup>150</sup>	31	S / NS	-	C-17	-	81%	81%
Schmidt <sup>103</sup>	58/4*	S / NS	I-II-III	gpa	-	Si	Si
Kukoski <sup>154</sup>	30	S / NS	-	Sc-181	83%	81%	86%
<b>Garcia-Velasco</b>	<b>84</b>	<b>S / NS</b>	<b>I-II-III</b>	<b>M-20</b>	<b>60.6%</b>	<b>58.6%</b>	<b>50%</b>

Abreviaturas: H, histología; S, seminoma; NS, no-seminoma; Ac, anticuerpo; Ampl gen, amplificación genética; pts, pacientes; DNE, datos no expuestos.

\*De los 58 casos analizados solo se realizó inmunohistoquímica en cuatro.

\*\* Anticuerpos utilizados en los estudios: C-17, santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,USA; gpa (goat polyclonal antibodies anti-Cyclin D2), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; Anticuerpos anti-ciclina D2 Clon M-20, Santa Cruz Biotechnology, California, USA

¶ Guiones (-) indican “no realizado” en el trabajo publicado.

† Solo se describe presencia o ausencia de tinción para ciclina D2 en la inmunohistoquímica.

A pesar de las posibles implicaciones de una dis-regulación del control del punto de restricción (R) en la quimiosensibilidad de los TCGs, no hay ningún trabajo publicado hasta el momento que relacione la expresión tisular de las ciclinas con la respuesta al cisplatino en estas neoplasias. En nuestro estudio se objetivó un mayor número de respuestas completas en pacientes con expresión de ciclina D2 negativa en el tumor, pero este dato no resultó estadísticamente significativo ( $p = 0.14$ ). En nuestra opinión, al igual que en el caso de mdm2, sería deseable un mayor número de pacientes para demostrar diferencias significativas.

#### **5.1.4.2 Expresión de ciclina D2 e impacto pronóstico**

Hasta el momento no se han encontrado diferencias en la expresión de ciclina D2 entre tumores de células germinales de distintos estadios clínicos, lo cual ha llevado a algunos autores a considerar la sobre-expresión de esta proteína un reflejo del proceso de tumorigénesis más que un dato de agresividad ó progresión tumoral en los TCGs<sup>150,103</sup>. En nuestra serie, al analizar los resultados de ciclina D2 en los diferentes estadios tumorales, hemos objetivado una relación estadísticamente significativa entre la sobre-expresión de la proteína y estadios mas avanzados ( $p = 0.05$ ), lo cual nos sugiere que la ciclina D2 podría ser un marcador de agresividad tumoral (Tabla 19).

Esta última hipótesis se afianza aún más a la luz de los resultados del análisis de supervivencia. La expresión de ciclina D2 en las muestras tumorales de nuestra serie muestra una fuerte tendencia a determinar una menor SLE (HR 2.26, 95%, IC 0.95-5.4;  $p = 0.06$ ).

En cuanto a SG, en cambio, la ciclina D2 no determinó diferencias significativas. Al analizar este dato hemos de tener en cuenta la mortalidad no relacionada con el tumor germinal (Dos pacientes fallecidos por shock séptico en el contexto de neutropenia febril, y otros 2 por un segundo tumor), la eficacia de los tratamientos de segunda y tercera línea, y el escaso número de pacientes del estudio.

**Tabla 19.** Expresión tisular de ciclina D2 y estadio tumoral según la AJCC

			Estadio		Total	<i>p</i>
			Is-IIa	IIa-III		
<b>Ciclina D2</b>	< 5%	Nº de pacientes	9	29	38	
		% dentro de grupo de expresión de ciclina D2	23,7%	76,3%	100,0%	
		% dentro de grupo de Estadio	69,2%	40,8%		
		% del total	10,7%	34,5%	45,2%	
	≥ 5%	Nº de pacientes	4	42	46	<b>0.05</b>
		% dentro de grupo de expresión de ciclina D2	8,7%	91,3%	100,0%	
		% dentro de grupo de Estadio	30,8%	59,2%		
		% del total	4,8%	50,0%	54,8%	
<b>Total</b>		Nº de pacientes	13	71	84	
		% dentro de grupo de expresión de ciclina D2	15,5%	84,5%	100,0%	
		% dentro de grupo de Estadio	100,0%	100,0%		
		% del total	15,5%	84,5%	100,0%	

A la luz de los resultados obtenidos en la valoración de la expresión tisular de la ciclina D2 parece que podemos encontrarnos ante un modelo similar al descrito en el cáncer de mama. Recientemente se ha demostrado que la expresión de las ciclinas E y D1 son factores pronósticos independientes para supervivencia en las neoplasias mamarias<sup>107</sup>. En el caso de los TCGs la ciclina D2 (en lugar de la D1) podría ser, junto a la ciclina E<sup>153</sup>, un marcador de agresividad y por lo tanto pronóstico. Para demostrar esta hipótesis sería necesario realizar un estudio con mayor número de pacientes y la suficiente potencia estadística, como en el caso del cáncer de mama.

## **6. CONCLUSIONES**

1. La proteína p53 está sobre-expresada en más del 50% de las muestras de tumores de células germinales de nuestro estudio, y, entre ellas, en el 100% de los seminomas. Esta variable no se relaciona de forma estadísticamente significativa ni con la respuesta al cisplatino, ni con la supervivencia libre de enfermedad, ni con la supervivencia global de los pacientes.
2. La sobre-expresión de mdm2 es muy frecuente en nuestra serie, con una intensidad de tinción mayor en los no-seminomas que en los seminomas. Dicha expresión no presenta ninguna relación (directa ó inversa) con la inmunoreactividad a p53 en las muestras analizadas. En nuestro estudio mdm2 no ha resultado un factor predictivo de respuesta a cisplatino ni ha establecido diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad ó en la supervivencia global de los pacientes.
3. La expresión tisular de ciclina D1 en los TCGs es poco frecuente (30%). En nuestra serie no se relaciona estadísticamente con la quimio-sensibilidad ó quimio-resistencia de los tumores, ni influye de forma significativa en el pronóstico de los pacientes en cuanto a supervivencia libre de enfermedad ó supervivencia global.
4. Hemos objetivado una expresión aberrante de ciclina D2 en más del 60% de las muestras analizadas. Dicha expresión no se relaciona significativamente con la respuesta al cisplatino. Sin embargo existe una relación estadísticamente significativa entre la sobre-expresión de ciclina D2 y tumores en estadios clínicos más avanzados, lo cual sugiere que podría ser un marcador de agresividad tumoral. La expresión de ciclina D2 en nuestra serie muestra una clara tendencia hacia una menor supervivencia libre de enfermedad ( $p = 0.06$ ), sin influir de forma significativa en la supervivencia global. Consideramos que sería necesario un estudio con mayor número de

pacientes para validar la ciclina D2 como marcador de agresividad tumoral y factor pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con TCGs.

## **7. ANEXOS**

## **7.1 ANEXO I. CENTROS COLABORADORES**

Los hospitales mencionados a continuación colaboraron mediante la aportación de material histológico de pacientes inicialmente diagnosticados de TCGs en dichos centros y que posteriormente fueron tratados en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

- Hospital Universitario Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares: Madrid)
- Complejo Hospitalario Juan Canalejo (La Coruña)
- Hospital Infanta Cristina (Badajoz)
- Complejo Hospitalario de Albacete
- Hospital General de Soria
- Complejo Hospitalario Torre Cárdenas (Albacete)
- Hospital Santa Bárbara (Puertollano; Ciudad Real)
- Hospital Virgen del Puerto (Plasencia; Cáceres)
- Hospital Nuestra Señora de Sonsoles (Ávila)
- Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín (Las Palmas de Gran Canaria)
- Hospital General Universitario de Elche
- Hospital de Mérida
- Hospital General de Segovia
- Complejo Hospitalario de Pontevedra
- Hospital Severo Ochoa (Leganés; Madrid)
- Hospital de León



## 7.2 ANEXO II. ABREVIATURAS

TCG.	Tumor de células germinales.
BHCG	Fracción beta de la gonadotropina coriónica.
TGNS	Tumor germinal no seminomatoso.
AFP	Alfafetoproteína.
H/E	Tinción hematoxilina/eosina.
TIN	Neoplasia intratubular testicular.
TP53	gen que codifica la proteína p53.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
OMS	Organización mundial de la salud.
CIS	Carcinoma in situ.
TC	Tomografía computerizada.
RM	Resonancia magnetica.
PET	Tomografía de emisión de positrones.
TNM	Tumor-Node-Metastases.
AJCC	American Joint Comite of Cancer.
UICC	Union Internationale Contre le Cancer.
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Colaborative Group.
BEP	Bleomicina, etopósido, ciasplatino.
EP	Etopósido, cisplatino.
VIP	Etopósido (ó VP16), ifosfamida y cisplatino.
SNC	Sistema nervioso central.
VeIP	Vinblastina, ifosfamida, cisplatino.
TIP	Paclitaxel, ifosfamida, cisplatino.
NY	Nueva Cork.
NER	Nucleotide excision repair.
CDDP	Cisplatino.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
XPA	Proteína del Xeroderma Pigmentado del grupo A.
ERCC1	Excision repair cross complementing 1.

XPF	Endonucleasa del Xeroderma Pigmentado F.
mARN	Ácido ribonucleico mensajero.
MMR	Mismatch repair pathway.
Mdm2	Proteína ligasa “mouse double minute”2.
MDM2	Gen que codifica la proteína mdm2.
EGFR	Epidermal growth factor receptor.
EGF	Epidermal growth factor.
SCF	Stem cell factor.
Rb	Retinoblastoma.
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclinas.
CCND1	Gen que codifica la proteína ciclina D1.
CCND2	Gen que codifica la proteína ciclina D2.
TASPE	Transplante autólogo de células madre (“stem cell”) hematopoyéticas periféricas.
RC	Respuesta completa.
NED	No evidencia de enfermedad.
RCBCMR	Respuesta completa biológica con masa residual.
RP	Respuesta parcial.
EE	Enfermedad estable.
P	No evaluable.
RCt	Respuesta completa total (al final del tratamiento multidisciplinar completo).
TS	Tiempo de seguimiento.
TP	Tiempo a la progresión.
TR	Tiempo en respuesta.
SG	Supervivencia global.
SLE	Supervivencia libre de enfermedad.
P50	Percentil 50

---

## 8. BIBLIOGRAFIA

<sup>1</sup> Sant M, Aareleid T, Berrino F, et al. and the EUROCARE Working Group. EUROCARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94, results and commentary. *Ann Oncol* 2004; 14 (Suppl 5): v61-v118.

<sup>2</sup> Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2000](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000), 2003.

<sup>3</sup> Parkin DW, Whelan SL, Ferlay J, et al. (eds): Cancer Incidence in five Continents, Volume VII. IARC Scientific Publications N° 143. Lyon, Francia: IARC 1997.

<sup>4</sup> Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 1997; 337: 242-253.

<sup>5</sup> Theodore Ch, Terrier-Lacombe MJ, Laplanche A, et al. Bilateral germ-cell tumours: a 22-year experience at the Institut Gustave Roussy. *Br J Cancer* 2004; 90: 55-59.

<sup>6</sup> Batata M, Chu F, Hilaris B, Golbey R, et al. Testicular cancer in cryptorchids. *Cancer* 1982; 49: 1023-1030.

<sup>7</sup> Nichols CR, Heerema NA, Palmer C, Williams SD, Einhorn LH. Klinefelter's syndrome associated with mediastinal germ cell neoplasms. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1290-1294.

<sup>8</sup> Forman D, Oliver RT, Brett AR, et al. Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis. *Br J Cancer* 1992; 65: 255-262.

<sup>9</sup> Schottenfeld D, Warshauer M, Sherlock S, et al. The epidemiology of testicular cancer in young adults. *Am J Epidemiol* 1980; 112: 232-237.

- <sup>10</sup> Ponles T, Bower M, Daugaard G, et al. Multicenter study of human immunodeficiency virus-related germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1922-1927.
- <sup>11</sup> Mac Vicar GR, Pienta KJ. Testicular Cancer. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 253-256.
- <sup>12</sup> Swart D, Jonson D, Hussey D. Should an elevated human chorionic gonadotropin titer alter therapy for seminomas? *J Urol* 1984; 131: 63-65.
- <sup>13</sup> Chung PW, Bayley AJ, Sweet J, et al. Spermatocytic seminoma: a review. *Eur Urol* 2004;45:495-498.
- <sup>14</sup> Bosl GJ, Bajorin DF, Sheinfeld J, Motzer RJ, Chaganti RSK. Cancer of the testis. En: De Vita VT, Hellman, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: J.B. Lippincott 2001: 1491-1518.
- <sup>15</sup> Motzer RJ, Bosl GJ. Hemorrhage: a complication of metastatic testicular choriocarcinoma. *Urology* 1987; 30: 119-125.
- <sup>16</sup> Skakkebaek N, Berthelsen J, Giwercman A, Muller J. Carcinoma *in situ* of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 1987; 10: 19-28.
- <sup>17</sup> Haddad FS, Sorini PM, Somsin AA, et al. Familial double testicular tumors: Identical chromosome changes in seminoma and embryonal carcinoma of the same testis. *J Urol* 1988; 139: 748-750.
- <sup>18</sup> Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Müller J. Carcinoma in situ of the undescended testis. *Urol Clin North Am* 1982; 9: 377-385.
- <sup>19</sup> Chaganti RSK and Houldsworth J. The cytogenetic theory of the pathogenesis of human adult male germ cell tumors. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1988; 106: 80-84.

- <sup>20</sup> Dieckmann KP, Loy V. Prevalence of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in patients with testicular germ cell neoplasms. *J Clin Oncol* 1996; 14: 3126-3132.
- <sup>21</sup> Donohue JP, Zachary JM, Maynard BR. Distribution of nodal metastases in nonseminomatous testis cancer. *J Urol* 1982; 315-320.
- <sup>22</sup> Hartmann JT, Fossa SD, Nichols CR, et al. Incidence of metachronous testicular cancer in patients with extragonadal germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1733-1738.
- <sup>23</sup> Hartmann JT, Nichols CR, Droz JP, et al. Prognostic variables for response and outcome in patients with extragonadal germ cell tumors. *Ann Oncol* 2002; 13: 1017-1028.
- <sup>24</sup> Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, et al. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol* 2004; 15: 1377-1399.
- <sup>25</sup> Mostofi FK, Sesterhenn IA. Histological typing of testis tumours. WHO International Histological Classification of Tumours, 2<sup>nd</sup> Edition. Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo: Springer 1998.
- <sup>26</sup> Murty VV, Bosl GJ, Houldsworth J, et al. Allelic loss and somatic differentiation in human male germ cell tumors. *Oncogene* 1994; 9: 2245-2251.
- <sup>27</sup> Leibovitch I, Foster RS, Kopecky KK, et al. Identification of clinical stage A nonseminomatous testis cancer patients at extremely low risk for metastatic disease: a combined approach using quantitative immunohistochemical, histopathologic, and radiologic assessment. *J Clin Oncol* 1998; 16: 261-268.

- <sup>28</sup> Lassen U, Daugaard G, Eigved A, et al. Wholebody positron emission tomography (PET) with FDG in patients with stage I Non-Seminomatous Germ Cell Tumors (NSGCT). *Eur J Nucl Med Imaging* 2003; 30: 396-402.
- <sup>29</sup> Bosl GJ, Gluckman R, Geller NL, et al. VAB-6: an effective chemotherapy regimen for patients with Germ cell tumors. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1493-1496.
- <sup>30</sup> Mencia PJ, Motzer RJ, Mazumdar M, Vlamis V, Bajorin DF, Bosl GJ. Advanced seminoma: treatment results, survival, and prognostic factors in 142 patients. *J Clin Oncol* 1994; 12: 120-126.
- <sup>31</sup> Mazumdar M, Bajorin DF, Bacik J, Higgins G, Motzer RJ, Bosl GJ. Predicting outcome to chemotherapy in patients with germ cell tumors: the value of the rate of decline of human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein during therapy. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2534-2541.
- <sup>32</sup> International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG): A prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. *J Clin Oncol* 1997; 15: 594-603.
- <sup>33</sup> Montironi R. Intratubular Germ cell neoplasia of the testis: testicular intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 2002; 41: 651-654.
- <sup>34</sup> Christensen TB, Daugaard G, Geertsen PF, et al. Effect of chemotherapy on carcinoma in situ of the testis. *Ann Oncol* 1998; 9: 657-660.
- <sup>35</sup> Warde P, Specht L, Horwich A, et al. Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4448-4452.
- <sup>36</sup> Dieckmann KP, Brüggeboes B, Pichlmeier U, et al. Adjuvant treatment of clinical stage I seminoma: is one single course of carboplatin sufficient? *Urology* 2000; 55: 102-106.

- <sup>37</sup> Oliver RT, Mason M, Mead GM, et al. Radiotherapy versus single-dose carboplatin in adjuvant treatment of stage I seminoma: a randomised trial. *Lancet* 2005; 366:293-300.
- <sup>38</sup> Aparicio J, Germa JR, Del Muro XP, et al. Risk-Adapted Management for Patients With Clinical Stage I Seminoma: The Second Spanish Germ Cell Cancer Cooperative Group Study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8717-8723.
- <sup>39</sup> Classen J, Schmidberger H, Meisner C et al. Radiotherapy for stages IIA/B testicular seminoma: final report of a prospective multicenter clinical trial. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1101-1106.
- <sup>40</sup> Ondrus D, Matoska J, Belan V, et al. Prognostic factors in clinical stage I non-seminomatous germ cell testicular tumors: rationale for different risk-adapted treatment. *Eur Oncol* 1998; 33: 562-566.
- <sup>41</sup> Donohue JP, Thornhill JA, Foster RS, Rowland RG, Bihrlé R. Primary retroperitoneal lymph node dissection in clinical stage A non-seminomatous germ cell testis cancer. *Br J Urol* 1993; 71: 326-335.
- <sup>42</sup> Weissbach L, Bussar-Maatz R, Flechtner H, et al. RPLND or primary chemotherapy in clinical stage IIA/B nonseminomatous germ cell tumors? Results of a prospective multicenter trial including quality of life assessment. *Eur Urol* 2000; 37: 582-594.
- <sup>43</sup> Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. Treatment of disseminated germ cell tumors with cisplatin, bleomycin and either vinblastin or etoposide. *N Engl J Med* 1987; 316: 1435-1440.
- <sup>44</sup> Einhorn LH, Williams SD, Loehrer PJ, et al. Evaluation of optimal duration of chemotherapy in favorable prognosis disseminated germ cell tumors. A SECGS protocol. *J Clin Oncol* 1989; 7: 387-391.

- <sup>45</sup> De Wit R, Roberts JT, Wilkinson PM, et al. Equivalence of three or four cycles of bleomycin, etoposide and cisplatin chemotherapy and of 3- or 5-day schedule in good prognosis germ cell cancer: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1629-1640.
- <sup>46</sup> Levi JA, Raghavan D, Harvey V, et al. The importance of bleomycin in combination chemotherapy for good prognosis germ cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1300-1305.
- <sup>47</sup> Horwich A, Sleijfer DT, Fossa SD, et al. Randomized trial of bleomycin, etoposide and cisplatin compared with bleomycin, etoposide and carboplatin in good prognosis metastatic non-seminomatous germ cell cancer. A MRC/EORTC trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1844-1852.
- <sup>48</sup> De Wit R, Stoter G, Sleijfer DT, et al. Four cycles of BEP versus four cycles of VIP in patients with intermediate-prognosis metastatic testicular non-seminoma: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council. *Br J Cancer* 1998; 78: 828-832.
- <sup>49</sup> De Wit R, Lowerens M, de Mulder PH, et al. Management of intermediate prognosis germ-cell cancer: results of a phase I/II study of Taxol-BEP. *Int J Cancer* 1999; 83: 831-833.
- <sup>50</sup> Collette L, Silvestre RJ, Stenning SP, et al. Impact of the treating institution on survival of patients with “poor-prognosis” metastatic non-seminoma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Collaborative Group and the Medical Research Council Testicular Cancer Working Party. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 839-846.



- <sup>51</sup> Nichols CR, Catalana PJ, Crawford ED, et al. Randomized comparison of cisplatin and etoposide and either bleomycin or ifosfamide in treatment of advanced disseminated germ cell tumors: an Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1287-1293.
- <sup>52</sup> Bower M, Newlands E, Holden L, Rustin G, Begent R. Treatment of men with metastatic germ cell tumors with cyclical POMB/ACE chemotherapy. *Ann Oncol* 1997; 8: 477-483.
- <sup>53</sup> Motzer RJ, Mazumdar M, Bajorin DF, et al. High dose carboplatin, etoposide, and cyclophosphamide with autologous bone marrow transplantation in first-line therapy for patients with poor-risk germ cell tumors. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2546-2552.
- <sup>54</sup> Hartmann JT, Bamberg M, Albers P, et al. Multidisciplinary treatment and prognosis of patients with Central Nervous Metastases(CNS) from Testicular Germ Cell Tumor (GCT) origin. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 400 (Abstr 1607).
- <sup>55</sup> Schmoll HJ, Beyer J. Prognostic factors in metastatic germ cell tumors. *Semin Oncol* 1998; 25: 174-185.
- <sup>56</sup> Gerl A, Clemm C, Lamerz R, et al. Prognostic implications of tumor marker analysis in non-seminomatous germ cell tumors with poor prognosis metastatic disease. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 961-965.
- <sup>57</sup> Fossa SD, Stenning SP, Gerl A, et al. Prognostic factors in patients progressing after cisplatin-based chemotherapy for malignant non-seminomatous germ cell tumors. *Br J Cancer* 1999; 80: 1392-1399.
- <sup>58</sup> Andre F, Fizazi K, Culine S, et al. The growing teratoma syndrome: results of therapy and long-term follow up of 33 patients. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1389-1394.

- <sup>59</sup> Paz-Ares L. Eventos neoplásicos tardíos en tumores quimio-curables. Recidivas tardías y segundas neoplasias en tumores de células germinales y enfermedad de Hodgkin (Tesis doctoral) 1993. Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. España.
- <sup>60</sup> Herr HW, Scheinfeld J, Puc HS, et al. Surgery for a post-chemotherapy residual mass in seminoma. *J Urol* 1997; 157: 860-862.
- <sup>61</sup> De Santis M, Bokemeyer C, Becherer A, et al. Predictive impact of 2-18-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) for residual postchemotherapy masses in patients with bulky seminoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3740-3744.
- <sup>62</sup> Puc H, Heelan R, Mazumdar M, et al. Management of residual mass in advanced seminoma: results and recommendations from Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. *J Clin Oncol* 1996; 14: 454-460.
- <sup>63</sup> Scheinfeld J. The role of adjunctive postchemotherapy surgery for non-seminomatous germ-cell tumors: current concepts and controversies. *Semin Urol Oncol* 2002; 20: 262-271.
- <sup>64</sup> Hartmann JT, Candelaria M, Kuczyk MA, et al. Comparison of histological results from the resection of residual masses at different sites after chemotherapy for metastatic non-seminomatous germ cell tumors. *Eur J Cancer* 1997; 33: 843-847.
- <sup>65</sup> Fox EP, Weathers TS, Williams SD, et al. Outcome analysis for patients with persistent non-teratomatous germ cell tumor in post-chemotherapy retroperitoneal lymph node dissection. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1294 -1299.
- <sup>66</sup> Beyer J, Rick O, Siegert W, Bokemeyer C. Salvage chemotherapy in relapsed germ cell tumors. *World J Urol* 2001; 19: 90-93.

- <sup>67</sup> Fossa SD, Stenning SP, et al: Prognostic factors in patients progressing after cisplatin based chemotherapy for malignant nonseminomatous germ cell tumours. *Br J Cancer* 1999; 80: 1392-1399.
- <sup>68</sup> Bhatia S, Abonour R, Porcu P, et al. High-dose chemotherapy as initial salvage chemotherapy in patients with relapsed testicular cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3346-3351.
- <sup>69</sup> Motzer R and Sheinfeld J. Poor risk testicular cancer and high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4073-4074.
- <sup>70</sup> Motzer RJ, Nichols CJ, Margolin KA et al. Phase III randomized trial of conventional-dose chemotherapy with or without high dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell as first line treatment for patients with poor prognosis metastatic germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2007; 25: 247-256.
- <sup>71</sup> Kondagunta V, Bacik J, Donadio A, et al. Combination of Paclitaxel, Ifosfamide, and Cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2549-2555.
- <sup>72</sup> Ravi R, Ong J, Oliver RT, et al. Surgery as salvage therapy in chemotherapy resistant nonseminomatous germ cell tumors. *Br J Urol* 1998; 81: 884-888.
- <sup>73</sup> Gerl A, Clemm C, Schmeller N, et al. Late relapse of germ cell tumors after cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 1997; 8: 41-47.
- <sup>74</sup> Porcu P, Bhatia S, Sharma M, and Einhorn LH. Results of treatment after relapse from high-dose chemotherapy in germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1181-1186.
- <sup>75</sup> Einhorn LH, Donohue JP. PVB in disseminated testicular cancer. *Ann Int Med* 1977;87: 293-298.

- <sup>76</sup> Kartalou M, Essigmann JM; Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478: 23-43.
- <sup>77</sup> Mayer F, Honeker F, Looijenga LHJ, et al. Towards an understanding of biological basis of response to cisplatin based chemotherapy in germ cell tumors. *Ann Oncol* 2003; 14: 825-832.
- <sup>78</sup> Koberle B, Grimaldi KA, Sunters A, et al. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumor cells. *Int J Cancer* 1997; 70: 551-555.
- <sup>79</sup> Koberle B, Masters JR, Hartley JA, et al. Defective repair of cisplatin induced DNA damage caused by reduced XPA protein in germ cell tumors. *Curr Biol* 1999; 9: 273-276.
- <sup>80</sup> Isla D, Sarries C, Rosell R, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome in 12taxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 1194-1203.
- <sup>81</sup> Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non small lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-991.
- <sup>82</sup> Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, et al. Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 2002; 62: 2758-2760.
- <sup>83</sup> Spierings DCJ, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli. *J Pathol* 2003; 200: 137-148.
- <sup>84</sup> O'Connor PM, Jackman J, Bae I, et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; 57: 4285-4300.

- <sup>85</sup> De Feudis P, De Bernardis D, Beccaglia P, et al. DDP-induced cytotoxicity is not influenced by p53 in nine human ovarian cancer cell lines with different p53 status. *Br J Cancer* 1997; 76:474-479.
- <sup>86</sup> Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, et al. Germ cell tumors of the testis over-express wild-type p53. *Am J Pathol* 1996; 149: 1221-1228.
- <sup>87</sup> Kersemaeckers AM, Mayer F, Molier M, et al. Role of p53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1551-1561.
- <sup>88</sup> Riou G, Le M, Travagli JP, et al. Poor prognosis of p53 gene mutation and nuclear overexpression of p53 protein in inflammatory breast carcinoma. *Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1765-1767.
- <sup>89</sup> Curtin JC, Dragnev KH, Sekula D, et al. Retinoic acid activates p53 in human embryonal carcinoma through retinoid receptor-dependent stimulation of p53 transactivation function. *Oncogene* 2001;20: 2559-2569.
- <sup>90</sup> Cordon-Cardo C, Latres E, Drobniak M, et al. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994; 54: 794-799.
- <sup>91</sup> Jiang M, Shao ZM, Wu J, et al. P21/waf1/cip1 and mdm2 expression in breast carcinoma patients is related to prognosis. *Int J Cancer* 1997; 74: 529-534.
- <sup>92</sup> Datta MW, Macri E, Signoretti S et al. Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression. *Mod Pathol* 2001; 14: 437-442.
- <sup>93</sup> Eid H, Institoris E, Geczi L, et al. Mdm-2 expression in human testicular germ-cell tumors and its clinical value. *Anticancer Res* 1999; 19: 3485-3490.
- <sup>94</sup> Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995; 11: 101-105.

- <sup>95</sup> Cresta CM, Masters JR, Hickman JA, et al. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide induced apoptosis is associated with functional p53 and high Bax/Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 1996; 56: 1834-1841.
- <sup>96</sup> Arriola EL, Rodríguez-López AM, Hickman JA, Cresta CM. Bcl-2 overexpression results in reciprocal down-regulation of Bcl-X(L) and sensitizes human testicular germ cell tumours to chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene* 1999; 18: 1457-1464.
- <sup>97</sup> Mendelson J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6550-6555.
- <sup>98</sup> Madani A, Kemmer, Sweeny C, et al. Expression of c-kit and epidermal growth factor receptor (EGFR) in chemotherapy refractory non-seminomatous germ cell tumors. *Ann Oncol* 2003; 14: 873-880.
- <sup>99</sup> Mandoky L, Geczi L, Bodrogi I, et al. Clinical relevance of Her-2/neu expression in germ-cell testicular tumors. *Anticancer Res* 2004; 24: 2219-2224.
- <sup>100</sup> Loveland KL, Schlatt S. Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from mother natures gene knock-outs. *J Endocrinol* 1997; 153: 337-344.
- <sup>101</sup> Tian Q, Frierson H, Krystal G, et al. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol* 1999; 154: 1643-1647.
- <sup>102</sup> Strohmeyer T, Reissmann P, Cordon-Cardo C, et al. Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 6662-6666.
- <sup>103</sup> Schmidt BA, Rose A, Stenihoff C, et al. Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 4124-4221.

- <sup>104</sup> Leng X, Connell-Crowley L, Goodrich D, et al. S-phase entry upon ectopic expression of G1 cyclin-dependent kinases in the absence of retinoblastoma protein phosphorylation. *Curr Biol* 1997; 7: 709-712.
- <sup>105</sup> Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al. A novel cyclin encoded by a bcl-1 linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350: 512- 515.
- <sup>106</sup> Zhang X, Zhao M, Huang a, et al. The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *J Clin Neuroscience* 2005; 12: 166- 168.
- <sup>107</sup> Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1566- 1575.
- <sup>108</sup> Di Pietro A, De Vries EGE, Gietema JA, et al. Testicular germ cell tumors: the paradigm of chemo-sensitive solid tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2437-2456.
- <sup>109</sup> May M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Can Res* 1996; 68: 67-108.
- <sup>110</sup> Takano Y, Kato Y, Masuda M, Ohshima Y, and Okayasu I. Cyclin D2, but no cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol* 1999; 189: 194-200.
- <sup>111</sup> Bai M, Tsanou E, Agnantis NJ, et al. Proliferation profile of classical Hodgkin's lymphomas. Increased expression of the protein cyclin D2 in Hodgkin's and Reed Sternberg cells. *Mod Pathol* 2004; 17: 1338-1345.
- <sup>112</sup> Nakayama H, Nishiyama H, Higuchi T, et al. Change in cyclin D2 expression during murine testis development detected by fragmented cDNA subtraction method. *Dev Growth Differ* 1996; 38: 141-151.

- <sup>113</sup> Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, et al. Cyclin D2 is a FSH-responsive gene evolved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature (Lond)* 1996; 384: 470-474.
- <sup>114</sup> Chaganti RSK, Rodríguez E, and Bosl GJ. Cytogenetics of male germ cell tumors. *Urol Clin North Am* 1993; 20: 55-66.
- <sup>115</sup> Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Meloni AM, et al. Over-representation of chromosome 12p sequences and karyotypic evolution in i(12p)-negative testicular germ-cell tumors revealed by fluorescence in situ hybridisation. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 70: 85-93.
- <sup>116</sup> Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, et al. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 293-299.
- <sup>117</sup> Murty VVVS, and Chaganti RSK . A genetic perspective of male germ cell tumors. *Semin Oncol* 1998; 25: 133-144.
- <sup>118</sup> Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, and Looijenga LH. Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 2002; 62: 2758-2760.
- <sup>119</sup> Mai S, Hanley-Hyde J, Rainey GJ, et al. Chromosomal and extrachromosomal instability of the cyclin D2 gene is induced by Myc overexpression. *Neoplasia* 1999; 1: 241-252.
- <sup>120</sup> Vousden K H, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 504-604.
- <sup>121</sup> Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
- <sup>122</sup> Lowe SW. Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 547-553.



- <sup>123</sup> Kerley-Hamilton JS, Pike AM, Li N, et al. A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 6090-6100.
- <sup>124</sup> Eid H, Van Der Loou M, Institoris E, et al. Is p53 expression, detected by immunohistochemistry, an important parameter of response to treatment in testis cancer? *Anticancer Res* 1997; 17: 2663-2670.
- <sup>125</sup> Bourdon JC. P53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 277-282.
- <sup>126</sup> Flores ER, Tsai KY, Crowley D, et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 2002; 416: 560-564.
- <sup>127</sup> Emanuel PO, Unger PD, Burstein DE. Immunohistochemical detection of p63 in testicular germ cell neoplasia. *Ann Diag Pathol* 2006; 10: 269-273.
- <sup>128</sup> Christoph F, Kempkensteffen C, Wiekert S, et al. Frequent epigenetic inactivation of p53 target genes in seminomatous and nonseminomatous germ cell tumors. *Cancer Lett* 2006; 247: 137-142.
- <sup>129</sup> Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates mi-RNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124: 1169-1181.
- <sup>130</sup> Duale N, Lindeman B, Komada M, et al. Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Mol Cancer* 2007; 6: 53-74
- <sup>131</sup> Ulbright TM, Orazi A, deRiese W, et al. The correlation of p53 protein expression with proliferative activity and occult metastases in clinical stage I non-seminomatous germ cell tumors of the testis. *Mod Pathol* 1994; 7: 64-68.

- <sup>132</sup> Eid H, Geczi L, Magori A, et al. Drug resistance and sensitivity of germ cell testicular tumors: evaluation of clinical relevance of MDR1/Pgp, p53 and metallothionein (MT) proteins. *Anticancer Res* 1998; 18: 3059-3064.
- <sup>133</sup> Riou G, Barrois M, Prost S, et al. The p53 and mdm2 genes in human testicular germ-cell tumors. *Mol Carcinogen* 1995; 12: 124-131.
- <sup>134</sup> Baltaci S, Orhan D, Turkolmez K, et al. P53, bcl-2, and bax immunoreactivity as predictors of response and outcome after chemotherapy for metastatic germ cell testicular tumors. *BJU Int.* 2001; 87: 661-666.
- <sup>135</sup> Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi FK, et al. Prognostic risk factors that identify patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors at low risk and high risk for metastases. *Cancer* 1998; 83: 1002-1011.
- <sup>136</sup> Chou PM, Barquin N, Guinan P, et al. Differential expression of p53, c-kit, and CD34 in prepubertal and postpubertal testicular germ cell tumors. *Cancer* 1997; 79: 2430-2434.
- <sup>137</sup> Albers P, Orazi A, Ulbright TM, et al. Prognostic significance of immunohistochemical proliferation markers (Ki-67, MIB-1, and proliferation-associated nuclear antigen), p53 protein accumulation, and neovascularization in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Mod Pathol* 1995; 8: 492-497.
- <sup>138</sup> Lewis DJ, Sesterhenn IA, McCarthy WF, et al. Immunohistochemical expression of P53 tumor suppressor gene protein in adult germ cell testis tumors: clinical correlation in stage disease I. *J Urol* 1994; 152: 418-423.
- <sup>139</sup> Bartkova J, Bartek J, Lucas J, et al. p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ cell neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 49: 196-202.

- <sup>140</sup> DeRiese WTW, Orazi A, Foster RS, et al. The clinical relevance of p53 expression in early stage non-seminomatous germ cell tumors. *J Urol* 1993; 149: 311A.
- <sup>141</sup> Bokemeyer C, Kuczie MA, Serth J, et al. Treatment of clinical stage I testicular cancer and a possible role for new biological prognostic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 27: 975-979.
- <sup>142</sup> Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al. The Mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transactivation. *Cell* 1992; 69: 1237-1245.
- <sup>143</sup> Alarcón-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2 the affair that never ends. *Carcinogenesis* 2002; 23: 541-547.
- <sup>144</sup> Rodríguez E, Matew S, Reuter V, Ilson DH, Bosl GJ, Chaganti RSK. Cytogenetic analysis of 124 prospectively ascertained male germ cell tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 2285-2291.
- <sup>145</sup> Oliver RTD, Shamash J, Berney DM. P53 and MDM2 in Germ Cell Cancer treatment response. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3928-3929.
- <sup>146</sup> Riou G, Barrois M, Prost S, et al. The P53 and MDM2 genes in human testicular germ-cell tumors. *Mol Carcinogen* 1995; 12: 124-131.
- <sup>147</sup> Fleischhacker M, Strohmeyer T, Inai Y, Salmón DJ, Koeffler HP. Mutations of the p53 gene are not detectable in human testicular tumors. *Mod Pathol*, 1994 ; 7 : 435-439.
- <sup>148</sup> Goodsell DS. The molecular perspective: Cyclins. *Oncologist* 2002; 9: 592-593.
- <sup>149</sup> Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, et al. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumors. *APMIS* 2003; 111: 252-265.

- <sup>150</sup> Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, et al. D-Type cyclins in adult human testis and testicular cancer : relation to cell type, proliferation, differentiation, and malignancy. *J Pathol* 1999;187: 573-581.
- <sup>151</sup> Malek NP, Casper J, Looijenga LH, et al. Quantification of additional short arms of chromosome 12 in germ cell tumors using the polymerase chain reaction. *Eur J Cancer*, 1997; 33:1488-1494.
- <sup>152</sup> Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J. Cell cycle regulation in testicular cancer : loss of p18INK4C marks progression from carcinoma in situ to invasive germ cell tumors. *Int J Cancer*, 2000; 85: 370-375.
- <sup>153</sup> Datta MW, Renshaw AA, Dutta A, et al. Evaluation of cyclin expression in testicular germ cell tumors: Cyclin E correlates with tumor type, advanced clinical stage, and pulmonary metastases. *Mod Pathol* 2000; 13: 667-672.
- <sup>154</sup> Kukoski R, Blonigen B, Macri E, et al. p27 and CyclinE/D2 associations in testicular germ cell tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2003; 11: 138-143.
- <sup>155</sup> Albers P, Ullbright TM, Albers J, et al. Tumor proliferative activity is predictive of pathologic stage in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumors. *J Urol*, 1996; 155: 579-586.